



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ASPECTOS DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DO MUNICÍPIO DE
TERESINA, PIAUÍ, BRASIL.**

NILTON ANDRADE MAGALHÃES

NILTON ANDRADE MAGALHÃES

**ASPECTOS DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DO MUNICÍPIO DE
TERESINA, PIAUÍ, BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção de título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa.

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

M188a Magalhães, Nilton Andrade
Aspectos das leishmaniose em área endêmica no município
de Teresina, Piauí, Brasil / Nilton Andrade Magalhães – 2015.
114 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

1. Endemia 2. Epidemiologia 3. Leishmaniose 4. LTA
5. Teresina-PI I. Título

CDD 616.936 4

ASPECTOS DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DE TERESINA PIAUÍ

NILTON ANDRADE MAGALHAES

Tese Aprovada em: 07/03/2014

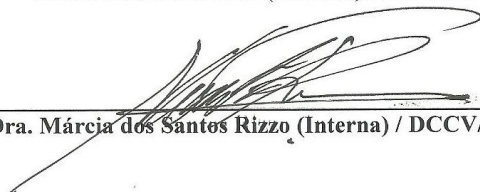
Banca Examinadora:



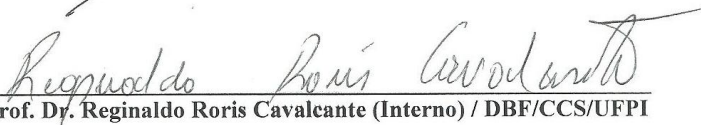
Profa. Dra. Maria das Graças Prianti (Presidente) / CET



Profa. Dra. Hiro Goto (Externa) / IMT/USP



Profa. Dra. Márcia dos Santos Rizzo (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Reginaldo Roris Cavalcante (Interno) / DBF/CCS/UFPI



Prof. Dr. Fábio Henrique Evangelista de Andrade (Externo) / UEMA

DEDICO

A minha mãe “in memoriam” pelo seu caráter, dignidade, dedicação, doação e firmeza para lutar pelos seus objetivos tornando-a exemplo de vida.

A minha irmã, Neide Maria, que na ausência de nossa mãe sempre esteve ao meu lado me apoiando e me dando força.

A minha filha, Letícia Maria, que mesmo distante me fortalece constantemente na busca dos meus objetivos.

A todos demais familiares e amigos que sempre me incentivam na busca dos meus objetivos.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”

(Albert Einstein).

AGRADECIMENTOS

A DEUS, “causa inteligente de todas as coisas do universo”, pois sem sua permissão nada podemos realizar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, exemplo de competência, sabedoria e de pesquisador.

Às Dras. Hiro Goto e Maria das Graças Priant pelo apoio nos momentos mais necessários do desenvolvimento dessa tese, tornando-as co-orientadoras.

Ao Prof. Dr. Paulo Ribola e ao Dr. Diego Alonso, da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)/ Botucatu por ter dado total apoio e contribuição para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos amigos e colegas da pós-graduação pela imensa ajuda na colheita e processamento das amostras.

A aqueles que ao longo do desenvolvimento dessa pesquisa foram mais do que colegas, colaboradores, companheiros. São verdadeiros amigos!

À Gerência de Zoonoses de Teresina/PI pelo apoio e dedicação dos funcionários contribuindo de forma significativa na coleta de dados para esta pesquisa.

Aos professores da Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí

Aos funcionários da Pós-graduação Luis Gomes da Silva e Fábio Vinicius Nunes de Araújo Costa Moura, sempre prestativos.

Aos meus queridos e amados irmãos e sobrinhos Neivan, Neide, Aline, Aláise e José Artur pela presença constante em minha vida, pelo companheirismo, pelo amor que sempre nos uniu e pelos momentos felizes que sempre compartilhamos.

Aos demais membros da minha FAMÍLIA, pelo apoio e carinho necessários.

MUITO OBRIGADO!!!!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 LEISHMANIOSES	21
2.2 VETORES DAS LEISHMANIOSES.....	21
2.4 EPIDEMIOLOGIA	22
2.5 LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA.....	25
2.6 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	26
2.6.1 FORMAS CLÍNICAS DA LTA	28
2.6.2 LTA NAS ESPÉCIES DOMÉSTICAS E SILVESTRES.....	28
2.6.3 SITUAÇÃO DA LTA EM TERESINA/PI	29
2.7 CONTROLE.....	31
CAPÍTULO 1	32
ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE UMA ÁREA DE ELEVADA INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM TERESINA/PI, BRASIL.	32
1 - INTRODUÇÃO	34
2 – METODOLOGIA.....	36
2.1 Local e Período	36
2.2 Caracterização da área	36
2.3 População e Amostra	37
2.4 Variáveis de Estudo.....	37
2.5 Procedimentos Metodológicos	38
2.5.1 Captura de Insetos	38
2.5.2 Exames Laboratoriais.....	38

2.6 Análises dos Dados.....	39
4 - CONCLUSÃO.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO 2:	78
EQUÍDEOS INFECTADOS POR <i>Leishmania (Leishmania) Infantum</i> NA ÁREA ENDÊMICA DE TERESINA, PIAUÍ, BRASIL.....	78
Introdução	81
Metodologia.....	83
Local e Período	83
Caracterização da Área.....	84
População e Amostra	84
Procedimentos Metodológicos	85
Coleta de Material	85
Exames Laboratoriais.....	85
Conclusão	95
Referências Bibliográficas	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	100

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Distribuição de casos de leishmanioses no mundo (WHO, 2009)..... 24

CAPÍTULO 1

Figura 1. Faixa etária de ocorrência de LTA nos moradores do bairro Santa Teresa do município de Teresina/PI.....41

Figura 2. Nível de escolaridade dos moradores do bairro Santa Teresa de Teresina/PI.....42

Figura 3. Percentagem do número de pessoas que trabalham por residência no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....43

Figura 4. Renda mensal das famílias, baseado no valor de referência do piso salarial mínimo nacional, que residem no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....44

Figura 5. Tipos de animais silvestres observados próximo às residências no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....45

Figura 6. Local de trabalho dos moradores do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....46

Figura 7. Trabalhadores rurais do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....46

Figura 8. Espécies de animais domésticos presentes nas residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....48

Figura 9. Espécies de animais domésticos concomitantes presentes nas residências do bairro Santa Teresa, Teresina, PI.....48

Figura 10. Reservatórios domésticos das leishmânias no peridomicílio das residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	50
Figura 11. Sistema de esgoto das residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	51
Figura 12. Tipo de banheiros em residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	52
Figura 13. Distância das residências em relação à mata no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	52
Figura 14. Residência localizada dentro da mata no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	53
Figura 15. Residência localizada próximo à área de morros no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	54
Figura 16. Residência localizada próximo à área de morros no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	55
Figura 17. Tipos de anexos presentes nas residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	55
Figura 18. Anexo (galinheiros) presente em residência no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	56
Figura 19. Aspectos topográficos do bairro Santa Teresina, Teresina/PI.....	57
Figura 20. Residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI, localizadas em áreas alta e baixa.....	58

Figura 21. Forma de uso do solo no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	58
Figura 22. Residência localizada em meio a vegetação nativa no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	59
Figura 23. Densidade residencial do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	61
Figura 24. Densidade residencial no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	61
Figura 25. Condições das residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	62
Figura 26. Condições precárias de residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	63
Figura 27. Condições de pavimentação do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....	64
Figura 28. Rua do bairro Santa Teresa, Teresina/PI, com pavimentação precária e ausente.....	64

Figura 29. Acúmulo de lixo no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....65

Figura 30. Áreas com umidade, baixa luminosidade, acúmulo de matéria orgânica propícia ao desenvolvimento de flebotomíneos no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....66

Figura 31. Análise dos produtos de digestão da PCR com enzima de restrição Hae III para a região ITS1 de *Leishmania* em *Lutzomia longipalpis* em gel de agarose a 3%. Linhas 7, 9 e 12 representam fragmentos específicos para *Leishmania (Leishmania) infantum*. A 123 bp ladder foi usado como marcador molecular.....69

CAPÍTULO 2

Figura 1. Análise dos produtos de digestão da PCR com enzima de restrição Hae III para a região ITS1 de *Leishmania* em amostras de sangue de equídeos em gel de agarose a 3%. Linhas 2, 3 9 e 10 representam fragmentos específicos para *Leishmania (Leishmania) infantum*. A 123 bp ladder foi utilizado como marcador de tamanho molecular.....91

Figura 2. Sequência de bases nitrogenadas e eletrofenograma do sequenciamento gênico de amostras de sangue de equídeo positivo na “nested” PCR.....91

Figura 3. Sequência de bases nitrogenadasde *Leishmania (Leishmania) infantum* do banco de dados do Gen Bank.....91

LISTA DE TABELAS**REVISÃO DE LITERATURA**

Tabela 1. Ocorrência de LTA por faixa etária, em Teresina/PI, de janeiro a setembro de 2011.....30

Tabela 2. Casos de LTA em Teresina/PI segundo local de ocorrência, janeiro/setembro de 2011.....30

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Tipos de doenças presentes entre os moradores do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.....60

ASPECTOS DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DO MUNICÍPIO DE TERESINA, PIAUÍ, BRASIL.

RESUMO: Objetivou-se com essa pesquisa descrever aspectos socioeconômicos que possam contribuir para a ocorrência das leishmanioses e pesquisar infecção natural de equídeos por *Leishmania* sp em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) de Teresina, Piauí, Brasil. As leishmanioses são infecções causadas por protozoário do gênero *Leishmania*. Constituem grande problema de saúde pública mundial e que o ambiente exerce papel importante em seu aparecimento. O município de Teresina, Piauí, Brasil apresentou elevado crescimento populacional nos últimos anos havendo ocupação rápida e desordenada da periferia expondo sua população a prováveis locais de multiplicação silvestre das leishmânias e do seu vetor. Coletaram-se informações dos moradores em 210 residências e sangue periférico de 42 equídeos para pesquisa de DNA de leishmânia por nested ITS'1 PCR e sua especificação por meio da digestão do seu produto de amplificação com enzimas de restrição Hae III. Mais de 30% da população reside no bairro há mais de 30 anos; 41,0% tem idade entre 16 e 40 anos; 46,6% tem renda familiar de um salário mínimo; 20,5% são analfabetos; 20,9% são agricultores; 16,2% das residências não há fossa séptica; 88,6% residem próximo às matas e 32,4% tem contato com animais silvestres; aproximadamente 40% das residências são precárias ou semiprecárias; 59,5% das ruas não há pavimentação e em 36,6% da área não há coleta de lixo, esses são fatores que contribuem para a perpetuação da enfermidade. As características topográficas e ecológicas do bairro são favoráveis à ocorrência de LTA; As condições socioeconômicas, a falta de saneamento básico e a elevada população de animais domésticos e silvestres reservatórios, criam condições satisfatórias para o desenvolvimento de agentes infecciosos e parasitários, sobretudo a *Leishmania*. Dos 42 equídeos analisados todos eram assintomáticos, entretanto 50% foram PCR positivos para *Leishmania*. A digestão do produto da “nested” PCR permitiu identificar sequências de DNA de *Leishmania (Leishmania) infantum*, caracterizando a infecção como leishmaniose visceral. O sequenciamento das amostras corresponde à espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*. A presença de equídeos

infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* sugere sua participação no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral em Teresina/PI, Brasil.

PALAVRAS CHAVES: Endemia, Epidemiologia, Leishmanioses, LTA, Teresina

ASPECTS IN ENDEMIC AREAS OF LEISHMANIASIS FROM TERESINA CITY, PIAUÍ STATE, BRAZIL.

ABSTRACT: This research aimed to describe socioeconomic aspects that may contribute to the occurrence of leishmaniasis and search for equines natural infection for *Leishmania* sp in an endemic area of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) from Teresina City, Piauí State, Brazil. Leishmaniasis are infections caused by protozoans from the *Leishmania* genus. They constitute a great world public health problem and the environment exerts an important role in their emergence. Teresina, Piauí, Brazil presented a high population growth in the last years befalling a rapid and disorganized occupation in the suburbs exposing the population to probable places of sylvan multiplication of *Leishmania* and its vector. Data from local people in 210 residences and peripheral blood from 42 equines were collected to search for leishmania DNA by nested ITS'1 PCR and its specification by means of the digestion of amplification product with restriction enzymes Hae III. Over 30% of the population live in the district for over 30 years; 41,0% aged between 16 and 40 years; 46,6% have a family income of a minimum wage; 20,5% are illiterate; 20,9% are farmers; 16,2% of the residences do not have concrete cesspit; 88,6% live near the forest; 32,4% have contact with wild animals; approximately 40% of residences are precarious or semi precarious; 59,5% of the streets are not paved; and there is no garbage collection in 36,6% of the area. These factors contribute to the perpetuation of the disease. Topographic and ecological characteristics in the village are favorable to the occurrence of ATL. Socioeconomic conditions, lack of basic sanitation and the high population of domestic and sylvan animal reservoir create satisfactory conditions for the development of infectious and parasitic agents, especially *Leishmania*. Forty-two equines analyzed were all asymptomatic; however, 50% were PCR positives for *Leishmania*. The digestion of the product by "nested" PCR allowed us to identify DNA sequencing from *Leishmania (Leishmania) infantum*, characterizing the infection as visceral leishmaniasis. The sequence of the samples correspond to the species *Leishmania (Leishmania) infantum*. The presence of infected equines with *Leishmania (Leishmania) infantum* suggests its participation in the cycle of visceral leishmaniasis transmission in Teresina/PI, Brazil.

KEYWORDS: Endemic, Epidemiology, Leishmaniasis, ATL, Teresina/PI.

1. INTRODUÇÃO

O planeta vem passando por muitas transformações nos últimos anos não só em relação aos aspectos demográficos como também climáticos. Nesse contexto observa-se que 20% da população vivem em extrema pobreza, sem saneamento básico, educação e moradia adequada, assim como apresentando nutrição deficiente. Essas condições contribuem para o surgimento constante de novas formas de expressões de doenças já conhecidas anteriormente e a emergência de novas. As doenças parasitárias são um grande problema de saúde pública nos países pobres e em desenvolvimento (AULT, 2007), considerando estes aspectos, entre as doenças que devem ter uma atenção especial estão as leishmanioses (ALVAR et al., 2006).

As leishmanioses constituem grande problema de saúde pública mundial, com uma estimativa de 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes em todo mundo anualmente. A estimativa mundial de leishmaniose cutânea é de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos por ano, sendo que 95% ocorrem nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio (WHO, 2014). Em 2009 Dougall et al., relataram casos de leishmanioses na Oceania. Em 12 países da América Latina há registros da doença, sendo que 90% dos casos estão concentrados no Brasil (BRASIL, 2007), sendo que as regiões Norte e Nordeste respondem por aproximadamente 80% da casuística (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). No estado do Piauí no ano de 2009 foram registrados 104 casos de leishmaniose tegumentar americana, com coeficiente de detecção de 3,3 casos por 100.00 habitantes. O maior número de ocorrências foi nos municípios de Altos e Teresina representando 51% do total do estado (SNVS/MS, 2009).

Apesar dos registros apresentados, uma estimativa mundial em relação à incidência e prevalência da doença é difícil de ser determinada com precisão, uma vez que há subnotificações de casos, segundo Desjeux (2004).

As leishmanioses são caracterizadas como um grupo de doenças em que o meio ambiente exerce um papel importante em seu aparecimento pela escola criada por Pavlovski. Esta escola enfatizou o fator ambiente formando a tríade epidemiológica conjuntamente com o agente e o hospedeiro. Podendo ocorrer em

circuitos limitados por fatores ambientais como microclima, relevo geográfico, espécies de animais reservatórios e fauna flebotomínica (COSTA, 2005).

De acordo com Moura (2013) os fatores de risco ambientais que contribuem para a ocorrência da leishmaniose cutânea são residir em zona rural, próximo às matas, desmatamentos, presença de galinheiros próximos às residências, de animais no peridomicílio como, por exemplo, tatu e trabalho no setor agropecuário.

A ocorrência de marcantes alterações ambientais em algumas regiões predispõe a possibilidades do envolvimento de alguns animais domésticos em ciclos secundários do parasito, embora não colaborando efetivamente para a manutenção desses parasitos na natureza (LAURENTI, 2010).

O município de Teresina, Piauí, Brasil, onde essa pesquisa foi realizada, apresentou um elevado crescimento populacional nos últimos anos e, como consequência, houve uma ocupação rápida e desordenada da sua periferia, expondo sua população a extensas áreas cobertas por florestas tropicais e densa vegetação, locais prováveis de expansão das leishmânias e do seu vetor. À medida que a população adentra a estes ambientes, invade área propícia à infecção pelas leishmanioses. Considerando que essa população apresenta baixo poder econômico, vivendo em condições precárias de moradia, em meio ao acúmulo de matéria orgânica gerada pela própria população e animais domésticos em função das más condições sanitárias, apresenta maiores probabilidades de serem infectadas (DRUMOND; COSTA, 2011).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) possui uma diversidade de agentes, assim como a leishmaniose visceral americana (LVA), uma diversidade de reservatórios e de vetores, que apresentam diferentes padrões de transmissão. Aliado a isso, há um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos epidemiológicos, determinado um difícil controle da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

As leishmânias têm uma grande variedade de reservatórios mamíferos. As infecções mais comuns ocorrem nos mamíferos silvestres, no homem e animais domésticos como cães e equinos (ALMEIDA et al., 2005). Em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar, são encontrados equinos infectados por *Leishmania braziliensis*, o principal agente causador da LTA no Brasil (TOLEZANO, 1994).

A principal forma de transmissão das leishmanioses é pela picada do flebotomíneo contaminado, determinando infecções tanto em seres humanos como em animais, ocorrendo principalmente em países tropicais e subtropicais com climas quentes e úmidos. (GENARO, 2000).

A *Lutzomyia longipalpis* é o vetor desse parasito no continente americano apresentando hábitos peri e intradomiciliar (GAVATI et al., 2001), adaptando-se a ambientes modificados sendo comum encontrá-lo fora das residências, em canil, chiqueiro, galinheiro além de outros lugares sombreados onde as fêmeas encontram animais para o seu repasto sanguíneo (SOUSA, 2008).

Há estudos que demonstram a infecção de equídeos por *Leishmania (Vianna) braziliensis*, embora sua participação no ciclo infeccioso da LTA não esteja comprovada (TOLEZANO, 1994). Nesse contexto Duarte (2001) ao examinar 250 soros de equinos por meio de teste de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para LTA no Rio de Janeiro, verificou que 29 (11,6%) apresentaram positividade.

A infecção de equídeos por *Leishmania (Leishmania) infantum*, apresentando lesão cutânea, tem sido demonstrada em algumas regiões da Europa (SOLANO-GÁLLEGO et al., 2003; ROLÃO et al., 2005), em algumas áreas endêmicas de LTA humano na América do Sul, como Brasil e Venezuela, também foi encontrada elevada incidência de casos em equinos (MADEIRA et al., 2003), todavia no Brasil, este é o primeiro trabalho que demonstra a infecção, não somente de equinos, como de asininos e muares assintomáticos, por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Duarte et al., (2001), sugerem que os equinos, embora com menor relevância que os caninos, podem se transformar em mais um importante hospedeiro para esta antropozoonose, visto que são animais que estão frequentemente presentes no peridomicílio em áreas rurais, onde a LVA é reconhecida como uma endemia.

Deve-se destacar a importância dos animais de produção na cadeia de transmissão das leishmanioses, pois são, em potencial, capazes de transmitir doenças para as pessoas envolvidas diretamente na produção ou que convivem próximos a eles. Dessa forma, estudos nessa área almejam contribuir para redução ou até mesmo eliminação do impacto econômico negativo causado por essas doenças na produção animal, quando esse e/ou o homem forem acometidos (KOEHLER et al., 2006),

Em Teresina/PI não há relatos sobre a participação de equinos, asininos e muares na cadeia de transmissão das leishmanioses, permanecendo uma lacuna na epidemiologia dessa doença, havendo, portanto a necessidade de que seja feita uma avaliação se ocorre a participação desses animais na transmissão da doença, e realização da caracterização ecoepidemiológica da região. Essas informações têm como propósito contribuir para melhor elaboração de metas de controle dessas enfermidades na região.

O diagnóstico das leishmanioses pode ser realizado por métodos direto e indireto. Entre os métodos diretos tem-se o xenodiagnóstico, que consiste no isolamento do parasito utilizando-se o vetor natural, o qual é colocado sobre a pele do hospedeiro para se alimentar, e após o repasto é realizada a avaliação se ocorre presença de *Leishmania* no flebotomíneo, podendo utilizar diferentes técnicas, como por exemplo, a PCR (MISHALSKY et al., 2007).

Assim, objetivou-se com esta pesquisa descrever os aspectos socioeconômicos que possam contribuir para ocorrência da LTA e avaliar a participação dos equídeos na cadeia de transmissão da LTA em uma área de elevada ocorrência dessa enfermidade em Teresina, Piauí, Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são infecções causadas por protozoário hemoflagelado intracelular integrante do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae e da ordem Kinetoplastida. Este protozoário possui um flagelo e dois genomas representados pelo DNA nuclear e DNA de cinetoplasto (kDNA). Clinicamente pode-se observar uma variedade de sinais desde lesões cutâneas que podem curar espontaneamente até formas viscerotrópicas que é mais grave e potencialmente fatal. As leishmanioses são consideradas como sendo doenças negligenciadas e, assim, permanecem como um grave problema de saúde pública recebendo atenção especial pela Organização Mundial de Saúde - OMS (CORTES, 2008).

A doença resulta da multiplicação dos parasitos em células do sistema fagocítico mononuclear dos vertebrados (CASSILHAS, 2004; BOGLIOLO, 2006). As manifestações clínicas dessa enfermidade são bastante diversificadas sendo classificadas em quatro formas principais: cutânea (LC), cutânea-difusa (LCD), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) ou calazar (CIMMERMAN; CIMMERMAN, 2001). As diferentes manifestações clínicas são dependentes de diversos fatores, como: espécie de *Leishmania* envolvida, sua virulência e aspectos relacionados ao ambiente e hospedeiro, como status imunológico e nutricional, dentre outros (WHO, 2006).

2.2 VETORES DAS LEISHMANIOSES

Os vetores do gênero *Lutzomyia* são os responsáveis pela transmissão das leishmanioses nas Américas, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina (MARTINS, 2004). O conhecimento sobre seus criadouros é muito escasso, as formas imaturas são encontradas em detritos de fendas de rocha, cavernas, raízes do solo e de folhas mortas e úmidas, também nas forquilhas das árvores e em tocas de animais, ou seja, em solo úmido, e em ambientes ricos em matéria orgânica em decomposição (FELICIANGELI, 2004).

Nas diversas regiões do Brasil os insetos vetores recebem diferentes denominações populares como: “mosquito palha”, “birigui”, “flebótomo”, “asa dura”, “asa branca”, “cangalhinha” ou “provarinho”. Essas denominações provavelmente estão relacionadas às suas características físicas ou comportamentais (CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

Os flebotomíneos adultos vivem em locais úmidos e escuros, como se verifica nas florestas tropicais, alimentando-se de fontes naturais de açúcar. As fêmeas necessariamente se alimentam também de sangue para a ovogênese (KILLICK-KENDRICK, 1999). Elas realizam hematofagia geralmente à noite sendo que a escolha do hospedeiro vertebrado ainda é um processo pouco conhecido. Essa escolha é bastante variável sendo que uns são mais específicos e outros oportunistas (MISSAWA et al., 2008).

No Brasil há mais de 230 espécies de flebotomíneos (GALATI, 2003). Os vetores das leishmânias desenvolvem uma singular relação com os hospedeiros mamíferos do parasito desenvolvendo diversos tipos de ciclos de transmissão ao longo de todas as regiões do país. As espécies de flebótomos envolvidas no ciclo são: *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, encontrada em florestas primária e secundária; *Lutzomyia (N.) whitmani* presente em todo território brasileiro, predominando na região de Viçosa (MG) e no Nordeste do Brasil, preferencialmente em área de floresta primária e domiciliar e em anexos de criatórios como galinheiro e chiqueiro; *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* observadas nas regiões sul e sudeste em áreas frias e secas; *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* encontrada no estado do Pará e *L. flaviscutellata*, *L. (L.) amazonensis*, *Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi*, *Lutzomyia migonei* na Amazônia (RANGEL; LAINSON, 2009).

A principal espécie de flebótomo transmissora do agente causador da LVA no Brasil é a *Lutzomyia longipalpis* (GENARO, 2000), sendo bastante estudada em função da sua importância epidemiológica na transmissão da doença (RANGEL; VILELA, 2008).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses constituem um crescente problema de saúde pública mundial. Essas doenças apresentam uma epidemiologia muito diversificada. O

gênero *Leishmania* apresenta mais de 30 espécies, sendo que, aproximadamente 20 são infectantes para humanos. Em relação aos insetos vetores são descritos cerca de 80 espécies ou subespécies de dípteros flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK; ROUX, 2002). A epidemiologia pode ser zoonótica, que engloba reservatórios animais no ciclo de transmissão e antroponótica, na qual a infecção é transmitida homem a homem (DEDET; PRATLONG, 2003).

A estimativa de novos casos é de 1,3 milhões, e mortes entre 20.000 a 30.000 por ano em todo mundo. A estimativa mundial de leishmaniose cutânea é de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos por ano, sendo que 95% ocorrem nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio. É uma doença de pouca visibilidade e considerada negligenciada (WHO, 2014)

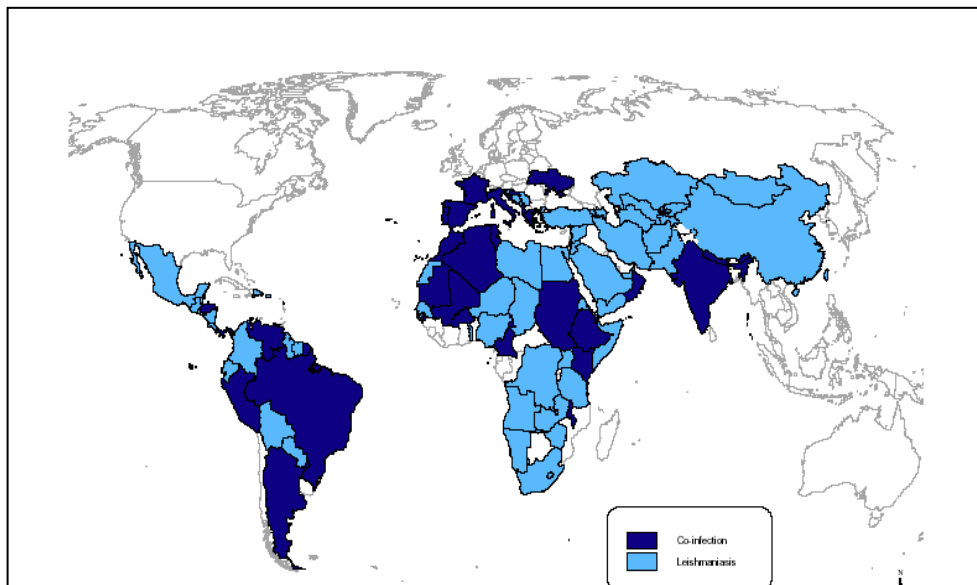


Figura 1. Distribuição de casos de leishmanioses no mundo (WHO, 2009)

Em 2010 ocorreram 22.296 casos de LTA no Brasil, sendo que 90,8% das pessoas acometidas tinham idade superior a dez anos; 71,4% pertencente ao sexo masculino; 94,5% era da forma cutânea, com coeficiente de incidência de 11,7 casos/ 100.000 habitantes e 40,6% dos casos ocorreram na região Nordeste (SINAN, 2010).

A LTA apresenta distribuição mundial, havendo uma estimativa de 350 milhões de pessoas em regiões endêmicas com risco de contrair a infecção. É amplamente distribuída no continente americano e sua presença já foi assinalada

desde o Sul dos Estados Unidos (Texas) até a República Argentina, alcançando maior importância no Brasil e no Peru. Como boa parte das zoonoses, a intensidade com que a leishmaniose tegumentar atinge o homem depende, principalmente, de alterações do meio ambiente (NEGRÃO; FERREIRA, 2009).

O número de casos de LTA ocorrido no Brasil no período de 2001 a 2010 foi de 248.834, com média anual de 24.883 casos. Ao longo desses dez anos pode-se verificar que houve uma redução no número de casos ocorridos havendo em 2010 17,5% menos casos do que em 2001; houve também uma redução da autoctonia de casos por municípios de 40,8% dos municípios do país em 2001 para 34,2% em 2010. Nesse mesmo período foram registrados 33.315 casos de LVA, com média anual de 3.332 casos. A doença apresenta um comportamento cíclico havendo elevação do número de casos em média a cada cinco anos sendo que há tendência crescente entre os ciclos. A partir do ano de 2004 houve uma tendência a estabilização da ocorrência da enfermidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

É comum ocorrer um efeito antrópico, ao invadir regiões de florestas onde há presença de forma enzoótica de espécies de leishmânia. O homem pode se infectar ao adentrar nesses ambientes (XIMENES, 2007). Havia perspectivas de redução de número de casos de LTA no Brasil com o desmatamento da floresta tropical, ficando restrito a áreas de florestas residuais, entretanto houve urbanização da enfermidade sem haver explicação plausível (NEGRÃO; FERREIRA, 2009).

A exploração desordenada em áreas que a LTA é considerada uma zoonose de animais silvestres, tem contribuído para a expansão da doença, assim como, também ocorre em áreas de colonização antiga, embora as características ecoepidemiológicas sejam distintas (ALMEIDA, 2006)

A LTA é classificada em silvestre, silvestre modificada e a periurbana de acordo com as regiões geográficas em que ocorrem. O primeiro tipo está relacionado à derrubada de matas e a exploração desordenada de florestas ocorrendo em surtos epidêmicos; o segundo ocorre em locais com pequenos focos residuais de mata primária ou em área peridomiciliar ou ainda em área relacionada com atividade agropecuária, ocorre como epidemias sazonais e o terceiro tipo está relacionado com área de colonização antiga podendo haver participação de animais sinantrópicos e domésticos envolvidos no ciclo ocorrendo de forma endo-epidêmico

ou peridomiciliar. Este tipo está relacionado a baixas condições socioeconômicas (BOSANO; CAMARGO, 2004).

No Brasil a LVA é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* e transmitida pelo inseto *Lutzomyia longipalpis*. Os principais reservatórios que participam do ciclo zoonótico são canídeos selvagens e domésticos, que desempenham importante papel na epidemiologia da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Há indicativo de que a disseminação de LVA no Brasil, que anteriormente restringia-se às áreas rurais e pequenas cidades do semiárido, tenha ocorrido a partir de uma epidemia que atingiu Teresina (PI) e depois São Luís (MA), disseminando-se, posteriormente, para as demais regiões do país (COSTA, 2011).

O comportamento epidemiológico da LVA é cíclico, há uma elevação do número de casos em média a cada cinco anos. Verificou-se também uma tendência crescente no período de 1980 a 2003. Na década de 1990 cerca de 90% dos casos ocorreram na região Nordeste (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004). Apesar da doença ainda ser predominante na região Nordeste houve uma redução do número da ocorrência de 73,5% do total de confirmados em 2001 para 47,1% em 2010 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2.5 LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA

A LVA é uma enfermidade de grande importância para saúde pública, pois é responsável anualmente por 59.000 óbitos (DA SILVA et al., 2010), resultante de aproximadamente 500.000 casos da doença, partindo de um valor estimado de 12 milhões de pessoas infectadas por ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS, 2012).

A distribuição geográfica possui íntima relação com movimentos populacionais, disponibilidade de reservatórios, modificações ambientais (ABRANTES; SILVEIRA, 2009), baixa condições econômicas (DANTAS-TORRES, 2006) e distribuição geográfica do vetor (COSTA, 2011).

A LVA ocorre em pelo menos em 12 países da América Latina, sendo que 90% dos casos se concentram no Brasil, predominantemente na região Nordeste. Sua ocorrência em determinadas áreas diz respeito basicamente à existência de um

vetor susceptível e de um receptor/hospedeiro também susceptível (GONTIJO; MELO, 2004).

A região Nordeste do Brasil é a que possui maior número de casos da doença, com 50% dos 3 a 4 mil casos anuais registrados no país. A doença, que era tipicamente rural, a partir de 1980 passou a ser responsável por epidemias urbanas, em cidades como Teresina (PI) e São Luís (MA) (COSTA et al., 2001).

Analisando fatores que interferem na disseminação do parasito entre os cães, DANTAS-TORRES et al. (2012) observaram que a existência de uma relação entre a sazonalidade, densidade populacional do vetor, a densidade e susceptibilidade da população canina, a preferência alimentar do vetor, a forma como os cães são criados (dentro ou fora das casas, e estas em áreas urbanas ou rurais), o grau de exposição dos cães aos vetores, a presença de outros reservatórios e o fato dos responsáveis não adotarem medidas preventivas, são fatores críticos que contribuem para a disseminação do agente etiológico da doença.

As variáveis que devem ser consideradas como antecedentes para os níveis endêmicos da LVA são constituídos por uma série de fatores inter-relacionados, tais como: existência de novas práticas agrárias, modelos de exploração do solo, processo de urbanização e as condições de moradia inadequadas nos centros urbanos, além de problemas operacionais nos programas de controle, propiciando a adaptação do vetor a novos nichos ecológicos (MOREIRA et al., 2005)

Os bairros periféricos sem rede de esgoto, com expressivo desmatamento, onde podem ser visto animais silvestres como gambás, raposas e tatus circulando nas ruas, e grandes áreas verdes com árvores frutíferas e deposição de matéria orgânica no solo, favorecendo a procriação e a manutenção de flebotomíneos, contribuindo ativamente para a adaptação destes vetores ao peridomicílio, essas são as condições importantes que estão associadas as áreas de risco da transmissão de LVA (OLIVEIRA et al., 2006).

2.6 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas.

Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando animais e o homem, que pode ser envolvido secundariamente no ciclo (OLIVEIRA NETO et al., 2000).

A doença é uma das endemias de maior importância para a saúde pública no Brasil, em função de vários fatores tais como: ampla distribuição no território nacional, havendo relatos de casos autóctones em todos os estados, ocorrência de formas clínicas graves e dificuldades quanto ao diagnóstico e tratamento (OLIVEIRA, 2006).

O agente causador da LTA é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (GRIMALDI; TESH, 1993), e no Brasil, é transmitida por vetores dípteros da família Psychodidae e gênero *Lutzomyia* e *Psychodopygus* (FALQUETO et al., 1991).

As espécies identificadas de *Leishmania* causadoras de LTA no Brasil, de acordo com Camargo-Neves (2004) foram: 1) *Leishmania (Viannia) braziliensis* - é a mais prevalente no homem e pode causar lesões cutâneas e mucosas, encontrada em todas as áreas endêmicas do país, tanto em áreas de colonizações antigas como recentes, é geralmente associada à presença de animais silvestres e sinantrópicos. É transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia*; 2) *Leishmania (Viannia) guyanensis* - causa, sobretudo, lesões cutâneas. Ocorre na margem norte do rio Amazonas, em áreas de colonização recente, estando associada aos edentados e marsupiais. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são a *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. Whitmani*; 3) *Leishmania (Leishmania) amazonensis* - responsável pela forma anérgica ou leishmaniose cutânea difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais e a *Lu. flaviscutellata* e a *Lu. olmeca* os principais vetores.

A leishmaniose dermatrópica/mucotrópica compreende a forma chamada leishmaniose cutânea mucosa (LCM), caracterizada por lesões desfigurantes no nariz, boca e faringe; a leishmaniose cutânea difusa (LCD), com lesões infiltrativas disseminadas sem tendência à ulceração; e a leishmaniose cutânea (LC), com lesões limitadas, ulceradas ou não. Acredita-se que a leishmaniose tegumentar seja uma doença autóctone do continente americano, sendo por isso sua denominação (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

2.6.1 FORMAS CLÍNICAS DA LTA

As formas clínicas da doença variam, conforme o agente etiológico, vetor e nas diversas áreas geográficas de ocorrência. Nas Américas, foram identificadas 11 espécies dermatrópicas que causam a doença humana e oito espécies que causam a doença em animais. No Brasil, foram detectadas sete espécies, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, sendo três delas mais prevalentes: *Leishmania (V.) braziliensis*, a *L. (V.) guyanensis* e a *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2007). Dessas a espécie que acomete o homem com maior prevalência é *Leishmania (Viannia) braziliensis*, causando lesões cutâneas e mucosas, estando presente em todas as regiões endêmicas de norte a sul do país (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A leishmaniose cutânea na América é também chamada de pian-bois, úlcera de lós chicleros, uta, úlcera de Bauru. As manifestações e a gravidade são variáveis, podem tender à latência, evolução rápida e autolimitada, persistência, disseminação, reativação e reinfeção parecem ser variáveis dependentes tanto do parasito quanto do hospedeiro. No local de inoculação da leishmânia forma uma lesão cutânea, de aspecto papulovesiculoso ou impetigóide, podendo haver regressão espontânea ou não, surgindo lesões cutâneas disseminadas e invasão posterior na mucosa nasofaríngea. Após período de incubação com média de um mês, surge no local da picada a lesão eritematopapulosa única ou múltipla evoluindo com vesiculação e posteriormente ulceração. As lesões típicas da doença são úlceras com bordas bem definidas, elevadas, infiltradas, eritematovioláceas fundo granuloso avermelhado recoberto por secreção serosa, acometendo principalmente áreas expostas. As úlceras tendem à cicatrização espontânea num período de três meses, apresentando características apergaminhada, atrófica e radiada semelhante a “aros de bicicleta” (CAMARGO – NEVES, 2004)

2.6.2 LTA NAS ESPÉCIES DOMÉSTICAS E SILVESTRES

Infecções por leishmânias que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e

equídeos). Com relação a este último seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não há esclarecimento definitivo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Nas Américas, a LTA é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas). Na região amazônica ela tem sido relatada primariamente como uma zoonose, com ciclo de transmissão ocorrendo entre flebotomíneos e animais silvestres (GUERRA et al. 2006).

Duarte et al.,(2001) sugerem que os equinos por serem animais que estão frequentemente presentes no peridomicílio de várias moradias das regiões rurais, podem se transformar em mais um importante hospedeiro desta antropozoonose, embora com menor relevância que os caninos.

A descrição da LTA em cães data do início do século XX, e a alta prevalência da doença nesta espécie e na equina em áreas endêmicas, principalmente no Brasil e na Venezuela, parecem implicá-las na cadeia de transmissão de *Leishmania* nos ambientes domiciliar e peridomiciliar (MADEIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2005).

Há várias citações relatando a presença de elevado percentual de cães infectados e/ou com sorologia positiva para *Leishmania* em áreas endêmicas de LTA humana no norte do Estado do Paraná (ZANZARINI et al., 2005; VELÁSQUEZ et al., 2006).

A ocorrência de equinos infectados por *Leishmania (L.) infantum* é relatada em diversos países do continente europeu, tais como: Alemanha (KOEHLER et al., 2002), a Espanha (SOLANO-GÁLLEGO et al., 2003), Portugal (ROLÃO et al., 2005) e em países das Américas Central e do Sul (AGUILAR et al., 1984; OLIVEIRA-NETO et al., 1988; RAMOS-VARA et al. 1996), esses relatos nos leva a acreditar que pode ocorrer também com a leishmaniose tegumentar.

2.6.3 SITUAÇÃO DA LTA EM TERESINA/PI

No período de 2007 a setembro de 2011, foram registrados 171 casos de LTA no município de Teresina (PI) sendo 148 (86,55%) da forma cutânea e 23 (13,45%) da forma mucosa, sendo que no período entre 2010 e 2011, maior número de casos de ocorreu no bairro Santa Teresa (Tabela 3), uma comunidade rural na zona leste de Teresina (PI) constituída de 11 localidades sendo denominada de “Grande Área da Santa Teresa”. A maioria dos casos evoluiu para cura das lesões (83,70%),

porém, 14,13% dos casos não foram acompanhados e 2,17% abandonaram o tratamento. A análise desse período revela predomínio de ocorrência dos casos em indivíduos do sexo masculino (103 casos, 60,23%). Em relação à faixa-etária (Tabela 2), predominou em pessoas entre 35-64 anos, seguida pela faixa-etária de 20-34 anos, indicando que os mais infectados se encontram em idade produtiva, dados obtidos do Sistema Nacional de Agravos Notificados – SINAN (2011)

Tabela 1. Ocorrência de LTA por faixa etária, em Teresina/PI, de janeiro a setembro de 2011.

Faixa etária	Nº de Casos	%
< 01 ano	1	2,04
01 – 04 anos	1	2,04
05 – 09 anos	2	4,08
10 – 14 anos	0	0,00
15 – 19 anos	2	4,08
20 – 34 anos	9	18,37
35 – 49 anos	13	26,53
50 – 64 anos	13	26,53
65 – 79 anos	6	12,24
80 anos e +	2	4,08
TOTAL	49	100,00

SINAN-FMS-TERESINA/PI

Tabela 2. Casos de LTA em Teresina/PI segundo local de ocorrência, janeiro/setembro de 2011.

Bairro	Nº de Casos	Bairro	Nº de Casos
Santa Teresa	15	Promorar	1
Itararé	2	Pedra Mole	1
Uruguai	2	Macaúba	1
Dois Irmãos	2	Centro	1
Ininga	1	Usina Santana	1
Parque Ideal	1	Santa Maria da Codipi	1
Santo Antonio	1	Satélite	1
Parque Piauí	1	Piçarreira	1
Primavera	1	Vale quem Tem	1
Saci	1	São Cristóvão	1

SINAN-FMS-TERESINA/PI

2.7 CONTROLE

O controle das leishmanioses deve ser abordado, de maneira abrangente, sob cinco aspectos: vigilância epidemiológica, medidas de atuação na cadeia de transmissão, medidas educativas, medidas administrativas e vacina. Aliadas à essas medidas a capacitação dos profissionais de saúde em todos os seus níveis, devem ser contínuas . (BOSANO; CAMARGO, 2004).

Não há propostas para controle de LTA dos reservatórios silvestres, porém os inquéritos nos animais domésticos devem ser estimulados para evidenciar sua participação, mesmo não sendo obrigatória tal medida. No entanto, em área de ocorrência concomitante de LTA e LVA, torna-se necessária a identificação da espécie do parasito, para que seja avaliada sua importância no ciclo, e assim permitir ao Ministério da Saúde tomar as medidas cabíveis. Outra medida importante acondicionamento adequado do lixo, evitando atrair reservatórios e vetores (BRASIL, 2007).

Esta tese apresenta a seguinte estrutura formal: Introdução e Revisão de Literatura; capítulo 01, contendo o artigo intitulado “**Aspectos socioeconômicos e epidemiológicos de uma área de elevada incidência de leishmaniose tegumentar americana em Teresina/PI, Brasil**”, que será submetido para publicação ao periódico **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; capítulo 02, contendo o artigo intitulado “**Equídeos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* na área endêmica de Teresina, Piauí, Brasil**” esse artigo será submetido para publicação no periódico **Veterinary Parasitology**.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE UMA ÁREA DE ELEVADA INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM TERESINA/PI, BRASIL.

Nilton Andrade Magalhães¹, Francisco Humberto da Silva Ribeiro¹; Eláine Gonçalves Oliveira¹, Aline Pereira Martins¹; José Arnaldo de Sá Junior¹; Cristian Francisco de Carvalho Oliveira¹; Maria das Graças Priant³; Hiro Goto⁴; Francisco Assis Lima Costa²

¹ Universidade Federal do Piauí, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária.

² Universidade Federal do Piauí, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Prof. DCCV – UFPI (fassisle@gmail.com)

⁴ Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de Soroepidemiologia,

Resumo: Objetivou-se com essa pesquisa descrever os aspectos socioeconômicos que possam contribuir para a ocorrência das leishmanioses em área endêmica de Teresina, Piauí. Leishmanioses são doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*; que o ambiente exerce papel importante em seu aparecimento. Vetores do gênero *Lutzomyia* são responsáveis pela transmissão das leishmanioses nas Américas. Nos últimos anos aumentaram os casos de LTA. Em Teresina, de 2007 a setembro de 2011, registraram-se 171 casos de LTA, 86,55% da forma cutânea e 13,45% da forma mucosa. Coletaram-se informações dos moradores em 210 residências. Mais de 30% da população reside no bairro há mais de 30 anos; sendo que 41,05% tem idade entre 16 a 40 anos; 46,66% tem renda familiar de um salário mínimo; 20,48% são analfabetos; 48,1% das residências uma pessoa trabalha; 20,87% são agricultores; 16,2% das residências não há fossa séptica; 88,57% residem próximo às matas e 32,38% tem contato com animais; 40% das residências são precárias; 59,52% das ruas não há pavimentação e em 36,6% da área não há coleta de lixo. As características topográficas e ecológicas do bairro favorecem ocorrência de LTA; condições socioeconômicas; falta de saneamento básico; presença de animais domésticos e silvestres criam condições para desenvolver agentes infecciosos e parasitários.

PALAVRAS CHAVES: Endemia, Epidemiologia, Leishmanioses, LTA, Teresina / PI.

SOCIOECONOMIC AND EPIDEMIOLOGIC ASPECTS FROM A HIGHLY INCIDENT AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS AREA IN TERESINA/PI, BRAZIL.

Abstract: This research aimed to describe the socioeconomic aspects that may contribute to the occurrence of leishmaniasis in the area of Teresina, Piauí. Leishmaniasis are diseases caused by parasites from the *Leishmania* genus where the environment exerts an important role in its emergence. Vectors from *Lutzomyia* genus are responsible for the transmission of leishmaniasis in America. ATL cases increased in the last years. In Teresina, from 2007 to September 2011, 171 ATL cases were registered, 86,55% in cutaneous form and 13,45% in viscous form. Information from local people in 210 residences were collected. Over 30% from population reside in the district for over 30 years; wherein 41,05% are between 16 and 40 years old; 46,66% have a family income of a minimum wage; 20,48% are illiterate; there is only one person working in 48,1% of the residences; 20,87% are farmers; 16,2% from the houses do not have a concrete cesspit; 88,57% live near the forest and 32,38% have contact with wild animals; 40% from the residences are precarious; 59,52% of the streets are not paved and there is no garbage collection in 36,6% of the area. Topographic and ecological characteristics from the suburb favor the emergence of ATL; socioeconomic conditions, lack of basic sanitation; presence of domestic and sylvan animals create conditions to develop infectious and parasitic agents.

KEYWORDS: Endemic, Epidemiology, Leishmaniasis, ATL, Teresina / PI.

1 - INTRODUÇÃO

Há várias espécies de parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, responsáveis por causar as leishmanioses. São mais de 30 espécies dentro desse gênero, sendo aproximadamente 20 infectantes para humanos, condicionando uma epidemiologia extremamente variada. São descritas aproximadamente 80 espécies e subespécies de dípteros flebotomíneos, como vetores de *Leishmania*²⁵.

De acordo com Pavlowski as leishmanioses integram um grupo de doenças onde o meio ambiente apresenta um importante papel em seu aparecimento. O fator ambiente é enfatizado dentro da tríade epidemiológica que é constituída pelo agente, meio ambiente e hospedeiro. Fatores ambientais como micro-clima, relevo geográfico, espécies de animais reservatórios e fauna flebotomínica, fornecem circuitos limitados para sua ocorrência¹⁸.

O baixo nível sócio econômico, pobreza, promiscuidade, falta de saneamento básico, que é muito comum no meio rural e na periferia das grandes cidades condiciona um ambiente propício para incidência da leishmaniose. Portanto é uma doença com elevada relação com nível de condições precárias prevalente na população¹³. A LTA integra o grupo de doenças negligenciadas atingindo, sobretudo indivíduos pobres que vivem em zonas rurais, favelas urbanas ou em zonas de conflito⁴⁸.

A transmissão das leishmanioses nas Américas é realizada por vetores do gênero *Lutzomyia*, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina, todavia pouco se conhece sobre seus criadouros. O que se conhece é que as formas imaturas são encontradas em detritos de fendas de rocha, cavernas, raízes do solo e de folhas mortas e úmidas e, também, nas forquilhas das árvores e em tocas de animais³².

A identificação das diversas espécies de leishmânias e vetores envolvidos na determinação da doença e veiculação do agente causador são essenciais para que seja possível traçar metas de prevenção e controle da enfermidade⁵².

Em todos os continentes observa-se que há transmissão dos parasitos em ciclos silvestres entre animais, em ambientes quentes e úmidos das florestas tropicais e subtropicais e até nas estepes e florestas temperadas do Mediterrâneo e

da Rússia. A relação do homem com esses ambientes favoreceu a ocorrência da doença sob a forma de zoonose, às vezes dividindo com os animais o papel de reservatório²⁷.

O desequilíbrio ambiental decorrente da ação do homem sobre as florestas induziu uma adaptação dos vetores e reservatórios silvestres da doença a ambientes peridomiciliar ou domiciliar²⁰.

Nos últimos anos aumentou o número de casos de LTA, assim como sua expansão geográfica. Atualmente é encontrada em todos os estados brasileiros apresentando diferentes perfis epidemiológicos relacionados às modificações socioambientais. Os diferentes padrões da doença estão relacionados aos locais de ocorrência em função das espécies de leishmânias e de vetores, aos ecossistemas e aos processos sociais de produção e de uso do solo¹⁰.

A LTA está em franca expansão, a priori sendo considerada uma doença de animais silvestres, acometendo pessoas que adentravam nas florestas, ocorrendo nas zonas rurais e periurbanas. No período de 1985 a 2003, a doença apresentou coeficientes de detecção que variaram de 10,45 a 21,23 por 100 mil habitantes, expandindo-se, nesse período para todos os estados da federação. Deve-se salientar que em 1980 havia relatos de caso de autocnia somente em 19 estados do país, A região nordeste vem registrando o maior número de casos (37,2% dos registros) e um coeficiente de detecção de 26,50 por 100 mil habitantes¹³.

As ações preventivas podem ser individuais e coletivas. As coletivas estão voltadas para o manejo ambiental tais como acondicionamento e destino correto do lixo, poda de árvores, distância de 400 a 500 metros entre as casas e a mata, etc. O diagnóstico precoce, o tratamento dos casos humanos e medidas educativas são essenciais, mas para isso são necessários conhecimentos acerca da epidemiologia da doença na região ou no foco, tais como a investigação e conhecimento total do caso, detecção da presença de animais e de vetores, presença de lixo, condições de moradia e delimitação da área de ocorrência¹¹.

Em Teresina/PI, foram registrados 171 casos de LTA no município no período de janeiro de 2007 a setembro de 2011, sendo que 148 (86,55%) apresentaram forma cutânea e 23 (13,45%) a forma mucosa³⁴.

A LTA está instalada no município de Teresina, e apesar da ocorrência desses casos humanos, nenhum estudo foi realizado na tentativa de elucidar o ciclo

de transmissão local, principalmente quanto à participação de animais domésticos na transmissão da doença, apesar de que em bairros antigos e com boa urbanização há ocorrência da enfermidade.

A melhoria das condições de vida da população é fator essencial para o controle da doença, no entanto são necessários estudos sobre seu padrão epidemiológico para dar suporte a futuras ações de profilaxia e controle dessa enfermidade no município.

Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo dos aspectos epidemiológicos que possam favorecer a ocorrência de LTA em área de alta incidência dessa protozoose no município de Teresina/PI/Brasil.

2 – METODOLOGIA

2.1 Local e Período

A pesquisa é um estudo transversal que foi realizado no município de Teresina /PI, no bairro Santa Teresa, onde foram identificados casos humanos de leishmaniose tegumentar americana no período de 2010 a 2011, baseado nos registros do Sistema Nacional de Agravos Notificados (SINAN) do referido município, do ano de 2011.

2.2 Caracterização da área

O maior número de casos de LTA humano do município de Teresina/PI, ocorreu no bairro Santa Teresa, que está localizado na zona rural leste-sudeste do município, km 11 da PI 113, a 118m de altitude, e $4^{\circ}58'08.73''S$ $48^{\circ}38'.31.77''O$ ²⁴, pertencendo ao complexo de localidades que abrange, também, os bairros Santa Rita e Caminho Novo, sendo denominado de “Grande área da Santa Teresa”. Atendida pela Equipe 0018 da Unidade Saúde da Família (USF). A população do bairro é de 1.848 habitantes⁴⁶, distribuídos em 436 domicílios, dados obtidos do Centro de Controle de Zoonose¹⁷.

2.3 População e Amostra

Foram realizadas coleta de informações dos moradores por meio de entrevistas estruturada e padronizada (APÊNDICE 01) em 210 residências, com perguntas elaboradas de acordo com as informações necessárias para obtenção da identificação dos fatores de risco para a ocorrência de LTA na área. As questões envolveram fatores socioeconômicos e ambientais relacionados ao risco de adquirir a doença. Em algumas residências foram colocadas armadilhas para captura de insetos.

O critério de escolha das residências foi a presença de animais domésticos como cães, gatos e equídeos. Esse critério foi adotado pela suposição de que a presença desses animais na residência pode ser um fator agravante para aumentar os riscos de ocorrência da doença.

Foram entrevistadas as pessoas que estavam no domicílio no momento da visita. O critério de exclusão foi ausência de maiores de idade e a recusa na participação da pesquisa.

Durante as visitas para realização da entrevista e colocação de armadilhas para captura de insetos, os proprietários foram informados sobre os objetivos da pesquisa e esclarecidos conforme recomendações da Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 196/96 e outras informações complementares constantes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE 02).

2.4 Variáveis de Estudo

As características socioeconômicas foram as variáveis de exposição pesquisadas por meio da entrevista. Também foi realizada a descrição da estrutura do domicílio, do ambiente peridoméstico e da estrutura física da região (Apêndice 01). Foram coletados dados sobre faixa etária dos residentes no domicílio, escolaridade do chefe da família, renda familiar, tipo de ocupação, local de trabalho, origem, número de pessoas no domicílio, nível de saúde e ocorrência de doença na família, tipo de sistema de esgoto e de abastecimento de água, presença de anexos

com fins criatórios (galinheiros e chiqueiros) e presença de animais de estimação na casa.

2.5 Procedimentos Metodológicos

2.5.1 Captura de Insetos

Foram colocadas armadilhas luminosas do tipo CDC (“Communicable Diseases Center”) no intra e peridomicílio a altura de aproximadamente 1,5m para a captura dos insetos. A colocação das armadilhas era realizada às 18:00h e recolhidas às 07:00h do dia seguinte, uma vez por mês no período de fevereiro a maio de 2012 por residência.

A identificação dos insetos foi realizada por técnicos do Laboratório de Entomologia do Centro de Controle de Zoonoses de Teresina, Piauí.

Após identificação os flebotomíneos foram acondicionados individualmente em microtubos de plásticos de 1,5mL e encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia da Universidade Estadual de Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, Campus do Rubião, Botucatu, para pesquisa de infecção por leishmânias por meio de técnicas de biologia molecular por “nested” PCR e posterior identificação da espécie por meio da digestão com enzima de restrição.

2.5.2 Exames Laboratoriais

Extração de DNA e reação de polimerase em cadeia (PCR)

A extração do DNA dos flebotomíneos foi realizada com “Chelex” (Bio-Rad). A solução com chelex foi preparada a 10% diluído em tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM (TE) 1X. Em seguida o inseto foi macerado em microtubos plásticos de 1,5mL contendo 300µL do TE; foi agitado em vórtex por 15 segundos e centrifugado a 1300 RPM por 20 minutos. Posteriormente foi incubada por 20 minutos a 95°C em banho seco. Logo após foi agitado em vórtex por 15 segundos e centrifugado a 1300 RPM por 20 segundos. O sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR.

Para realização da “nested” PCR ITS’1 (ribossomal internal transcribed spacer 1) foram utilizadas placas (Applied Biosystems) com 4 µL de DNA, dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (primers). Na primeira fase da reação, que amplificou parte do gene *ssu rDNA*, utilizando os seguintes primers: R221- 5’ GGTTCCTTTCCTGATTTACG 3’; e R332- 5’ GGCCGGTAAAGGCCGAATAG 3’, e na segunda reação os primers utilizados para amplificação foram 5.8S rRNA: LITSR- 5’ CTGGATCATTTTCCGATG 3’ e L5.8S- 5’ TGATACCACTTATCGCACTT 3’, conforme descrito por Schönian et al, (2003)⁴⁷.

A reação da PCR foi preparada com 12,5 µL de Go-taq (Promega), 1,0 µL de cada primer e 5,5 µL de água bidestilada conforme instruções do fabricante. A amplificação foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), com um ciclo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 53°C, 1 minuto a 72°C e 10 segundos a 72°C. O produto da “nested” PCR ITS’1 foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados em gel red (2µg/ml) e visualizado em Transluminador UV (Bioagency).

Após a obtenção dos produtos de amplificação, com aproximadamente 603 bp para a primeira reação e entre 300 a 350 bp para a segunda reação. Foi realizada digestão dos produtos da PCR (10 µL) com enzima de restrição *HaeIII*, seguindo as recomendações do fabricante (Hybaid GmbH Heidelberg, Alemanha). A reação de digestão foi preparada com 7,3 µL de água bidestilada, 2 µL de tampão de reação 10X, 0,2 µL de Bovine Serum Albumin (BSA), 10 µL do produto de PCR e 0,5 µL da enzima de restrição, incubando-se a 37°C por uma hora. Como controle positivo foi utilizado produto de PCR de DNA extraído de cultura de promastigota de *Leishmania*, e como controle negativo foi utilizado água bidestilada.

Os fragmentos de restrição foram analisados em gel de agarose a 3%, corados em gel red, visualizado em Transluminador UV e realizado a identificação das espécies de leishmânias seguindo os parâmetros estabelecidos por Schönian et al. (2003)⁴⁷.

2.6 Análises dos Dados

Para a análise dos dados as variáveis foram organizadas e tabuladas em planilhas do software Microsoft Office *Excel versão 2007* e no programa Graph Pad Prism 5, analisadas e calculadas as percentagens das variáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se avaliar, ainda que preliminarmente, as condições que podem favorecer a ocorrência da LTA, procedem-se a análise de alguns aspectos geográfico-populacionais e socioeconômicos, buscando-se entender a persistência da endemia, apesar da sucessão de eventos sociais modificadores do espaço³⁸.

As condições que podem favorecer a ocorrência da LTA devem ser avaliadas preliminarmente, considerando aspectos geográfico-populacionais e socioeconômicos, para que se possa entender a persistência da endemia, embora haja uma sucessão de eventos sociais modificadores do espaço³⁸.

A região pesquisada é atendida pela Equipe 0018 da Unidade de Saúde da Família (USF) Santa Teresa, contando com uma população média de 1.848 habitantes e 513 famílias cadastradas⁵⁰. De acordo com levantamentos feitos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Teresina (2011)¹⁷, especificamente a “Grande Área da Santa Teresa” possui 436 domicílios, sendo que 365 (83,71%) deles possuem cães domiciliados. O bairro é composto de 11 localidades (ou povoados), quais sejam: Santa Teresa, Gaspar, São João, Lagoa de Dentro, Serra do Coroatá, Mano Castelo Branco, Cancela, Caminho Novo, Morro Alegre e São Bento. O povoado Cancela foi o único a não ter casos registrados de LTA em 2011.

A doença, até pouco tempo, era considerada de animais silvestres, acometendo pessoas que entravam nas florestas, entretanto pode-se verificar que a LTA, atualmente, expandiu-se, ocorrendo tanto nas zonas rurais como periurbanas. No período de 1985 a 2003, a doença apresentou coeficientes de detecção que variaram de 10,45 a 21,23 por 100 mil habitantes. Nesse mesmo período houve uma expansão geográfica da LTA, de 19 unidades federadas em 1980 a todos os estados registrando autoctonia¹³.

A entrevista foi realizada em 210 residências do bairro. Pode-se verificar que a maioria dos moradores reside há mais de cinco anos no local (69,95%) e 27,7% são oriundos da própria região. O número de moradores por residência é bastante variável, sendo que em 74,52% varia de duas a cinco pessoas. A idade predominante dos moradores está entre 16 a 40 anos (figura 1). Essa faixa etária corresponde à fase produtiva em que há maior exposição em função dos movimentos pendulares para o trabalho e, dependendo da atividade, no local de

trabalho. De acordo com os dados do SINAM (2011)³⁴ a maioria dos casos de LTA ocorreu em pessoas entre 35-64 anos (53,06%), seguida pela faixa-etária de 20-34 anos (18,37%), evidenciando que a doença atinge principalmente pessoas em idade produtiva.

Aproximadamente 60% dos entrevistados estão em idade compreendida entre 16 a 60 anos (figura 1) que corresponde à faixa etária em que ocorreu o maior número de casos de LTA na região. Esses dados são semelhantes aos observados no Noroeste do Paraná onde a doença predominou em pessoas com idade variando de 30 a 49 anos³⁵. Esse fato pode justificado em função da maior exposição dessas pessoas às áreas de florestas devido suas atividades de trabalho.

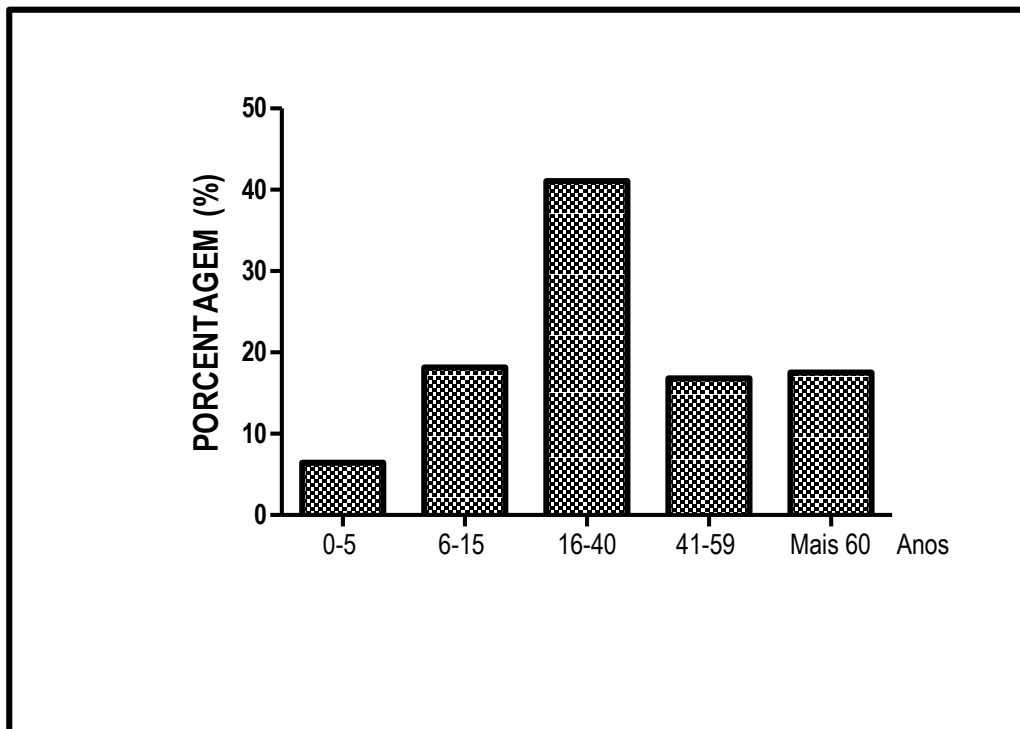


Figura 1. Faixa etária de ocorrência de LTA nos moradores do bairro Santa Teresa do município de Teresina/PI.

As medidas de controle das leishmanioses envolvem, dentre outras, os programas de educação em saúde. Uma população com baixo nível de escolaridade geralmente são resistentes a novas informações, tanto em aceitá-las quanto absorvê-las e, sobretudo, colocá-las em prática. Na área pesquisada foi observado que aproximadamente 21% dos moradores não são alfabetizados e quase 30% possuem ensino fundamental incompleto (figura 2), sugerindo que os moradores da

dessa área são mais vulneráveis à aquisição dessas protozooses além de outras doenças parasitárias e infectocontagiosas, em função do seu baixo nível de escolaridade, uma vez que a LTA tem relação direta com esse fator.

Tem sido observado que em áreas urbanas com elevado potencial de transmissão da LTA, o baixo nível de escolaridade é um fator que tem contribuído para maior ocorrência da doença, verificado pelo maior índice de positividade da Intradermorreação de Montenegro (IDRM), assim como a cada dez anos acrescido a idade do indivíduo, a prevalência da doença aumentou em 19%²⁶. Há relatos também de que pessoas com maior nível de instrução tem 44% de possibilidade menor em serem infectadas comparada com as de menor instrução⁵.

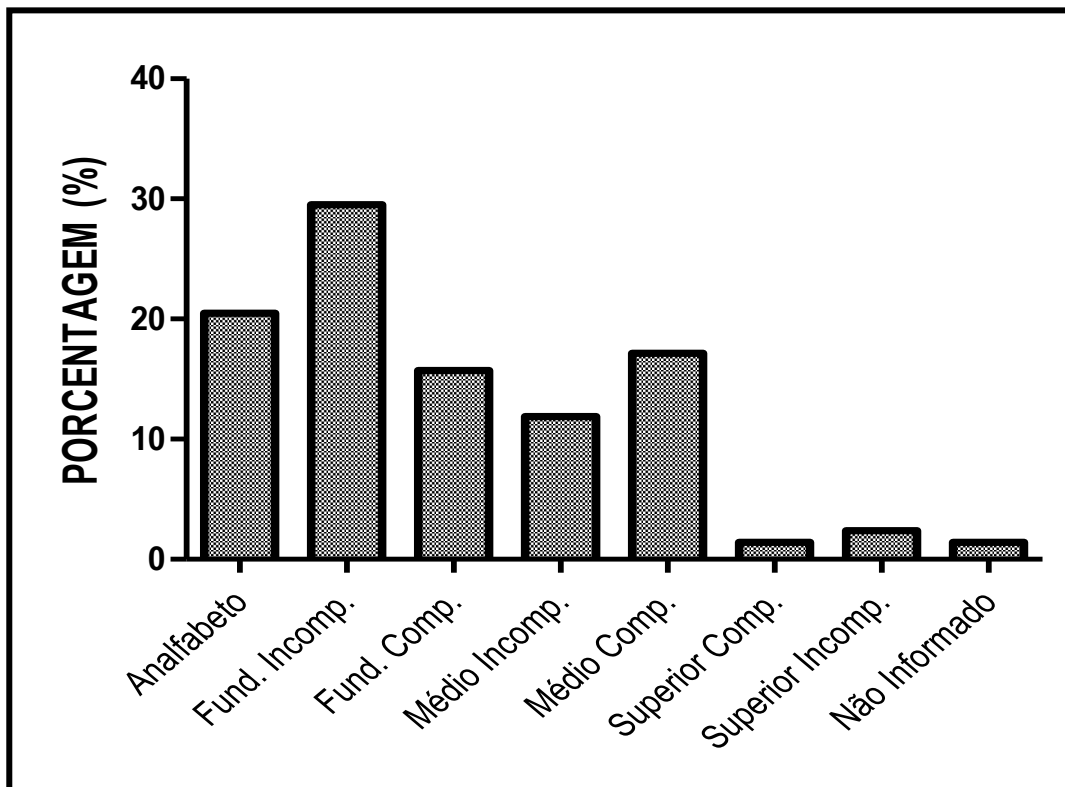


Figura 2. Nível de escolaridade dos moradores do bairro Santa Teresa de Teresina/PI.

Foi observado que apenas uma pessoa trabalha em aproximadamente metade das residências visitadas (figura 3), com renda mensal de um salário mínimo (figura 04), sendo que 20% trabalham na agricultura. Essas condições constituem-se fator de risco. As populações com baixo padrão socioeconômico são as mais atingidas pela LTA³³ concomitantemente com aquelas que adentram áreas de mata alterada por práticas agrícolas²⁸. Nossos resultados estão de acordo com os dados

da World Health Organization – WHO, (2008)⁵³ que afirmam também que a doença ocorre prioritariamente em áreas rurais carentes, desprovida de cuidados básicos de saúde, sobretudo em países em desenvolvimento.

A LTA apresenta três ciclos epidemiológicos: a) Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); b) Ocupacional ou lazer – em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo e c) Rural ou periurbana – em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio³⁰.

A área estudada apresenta características propícias que se enquadram nos três perfis epidemiológicos citados, pois é uma área de vegetação primária com devastação tanto para a construção de residências como para a exploração agropecuária, com significativa presença de animais silvestres, inclusive nas áreas peridomiciliares. Neste aspecto, mais de 30% dos entrevistados relataram a presença de animais silvestres na proximidade das residências, principalmente raposa e mucura, que são reservatórios silvestres de leishmânias (figura 5).

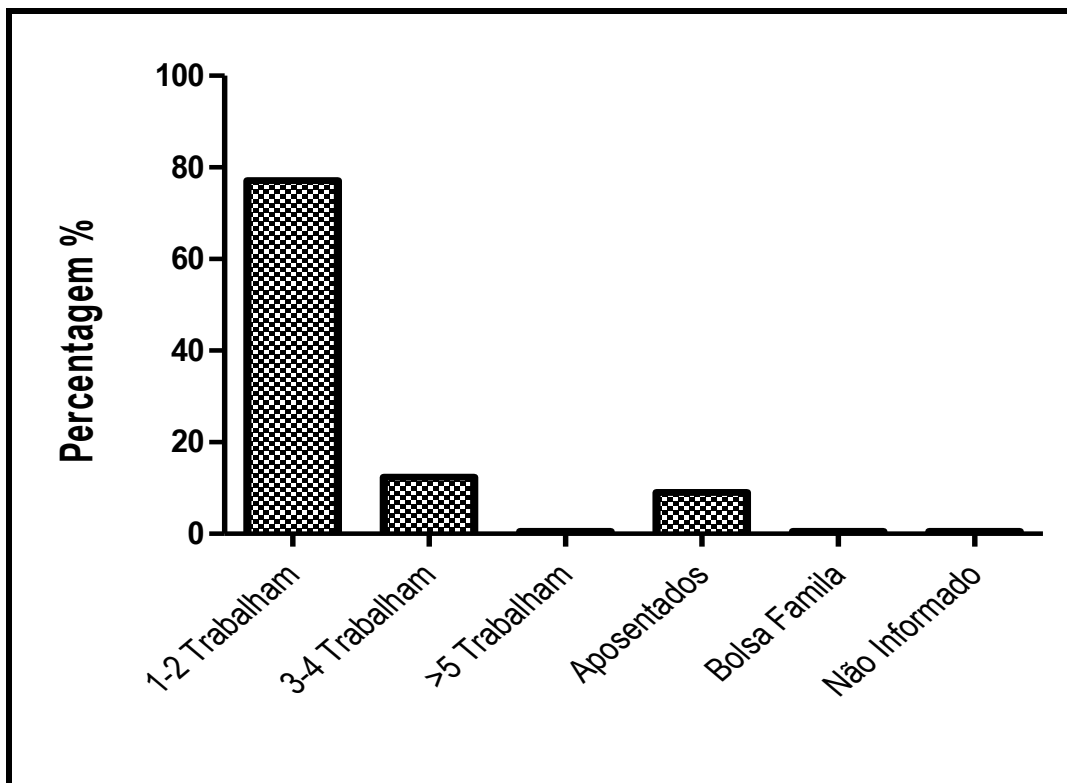


Figura 3. Porcentagem do número de pessoas que trabalham por residência no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Em relação ao local de trabalho (figura 6) foi verificado que a maior parte dos entrevistados trabalha em área rural (figura 07) e que pouco mais de 30% trabalham fora da localidade em área urbana do município. Essa relação entre a predisposição para ocorrência de LTA e o ambiente de trabalho, como relatado pelo SINAM (2011)³⁴, foi relatado também em outras regiões do Brasil, como em Mato Grosso onde o maior número de casos da doença ocorreu entre pessoas que trabalham na agricultura e pecuária, principalmente homens, caracterizando a existência de um ciclo silvestre³⁹.

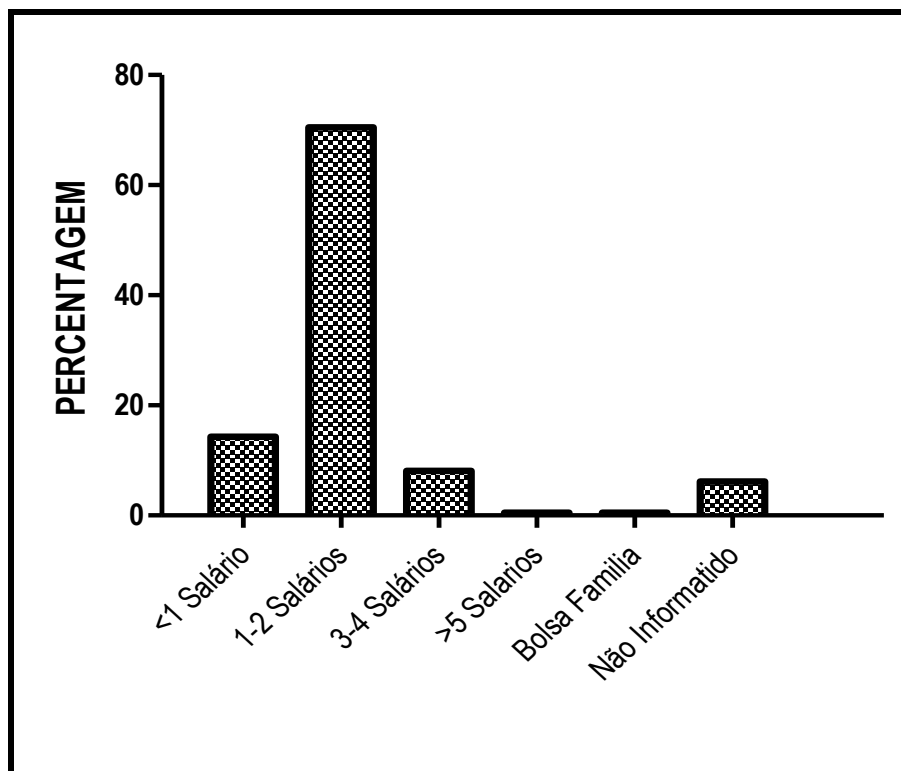


Figura 4. Renda mensal das famílias, baseado no valor de referência do piso salarial mínimo nacional, que residem no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Cerca de 60% dos casos ocorridos na região da Grande Santa Teresa, no período de 2007 a 2011 afetaram indivíduos do sexo masculino em idade produtiva³⁴. Atividades de lazer em área rural próximas a rios e córregos nas matas alteradas, constituem importante local de infecção¹⁹, assim como atividades agropecuárias. A LTA era uma doença rural, todavia, vem se manifestando numa interface urbano-rural no Brasil³⁹. Assim pode-se verificar que a doença está intimamente relacionada às mudanças ambientais como, por exemplo, o desmatamento.

Muitas vezes ocorre um efeito antrópico, ou seja, o homem infecta-se ao alterar o ambiente, interpondo-se ao ciclo silvestre ao adentrar nesse ecossistema. Dessa forma, o homem se infecta ao entrar em contato com as áreas florestais onde existem as enzootias pelas diferentes espécies de *Leishmania*⁵³. Tal situação foi observada neste estudo, visto que a maioria dos moradores da área estudada trabalha em área rural em meio à vegetação.

A doença apresenta mudanças no seu padrão, tendendo à urbanização e transmissão peridomiciliar, havendo possibilidade do envolvimento de animais domésticos na sua transmissão. Esse fato é reforçado pela ocorrência da alta incidência de cães infectados associada à doença humana⁵¹.

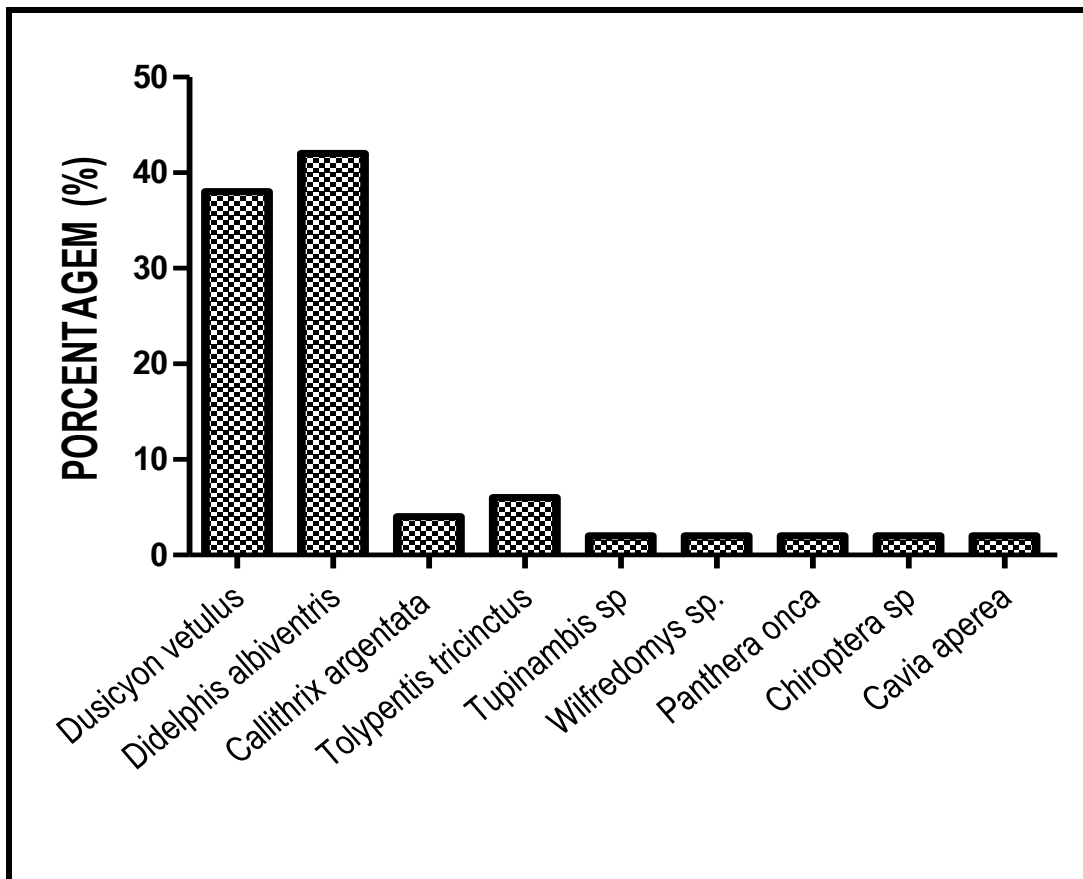


Figura 5. Tipos de animais silvestres observados próximo às residências no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

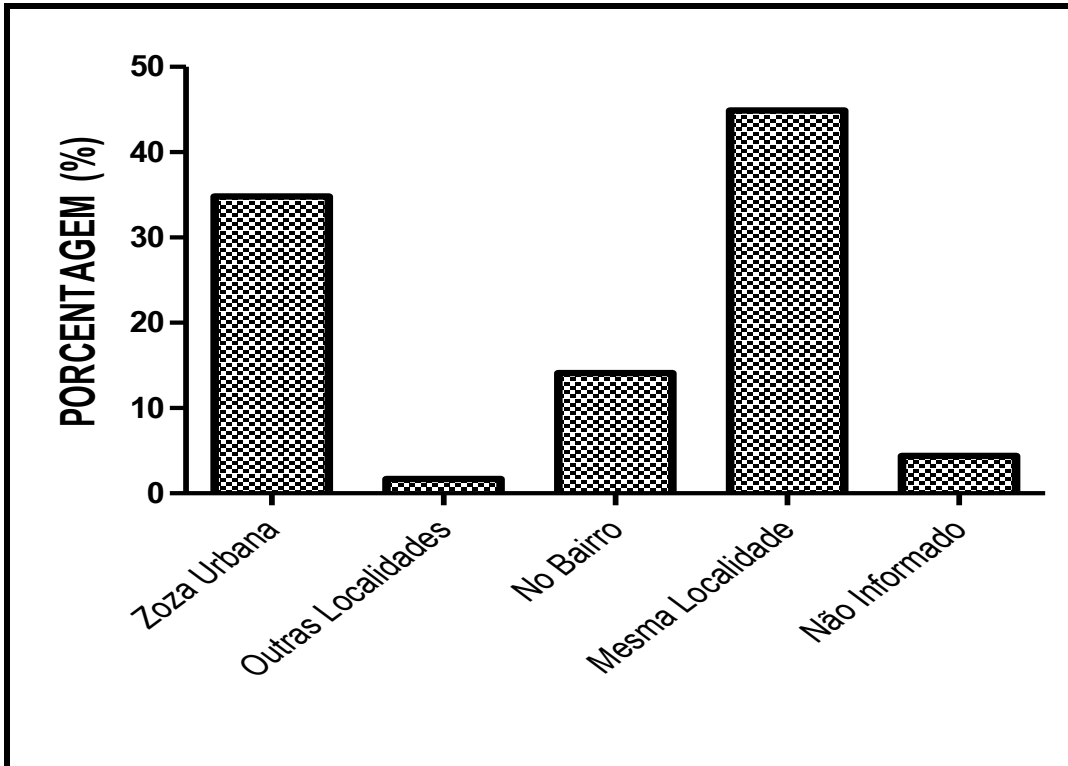


Figura 6. Local de trabalho dos moradores do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.



Figura 7. Trabalhadores rurais do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Havia uma expectativa de diminuição da incidência de LTA no país, restringindo-se a regiões próximas das matas residuais. Entretanto, esse fato não ocorreu, e o que se verifica é a urbanização da LTA, processo esse que não está suficientemente explicado. Alguns fatores podem estar implicados, tais como: domiciliação do flebótomo, aumento da população canina, que é o principal reservatório doméstico de leishmânia³⁸.

A presença de animais domésticos que participam do ciclo de transmissão da LTA é um fato marcante nas residências do bairro Santa Teresa. Em 83,71% das residências tem a presença de cães, segundo dados do Centro de Controle de Zoonoses de Teresina (2011)¹⁷. No estudo constatou-se que em 66,57% das residências o cão está presente, sendo que em algumas residências além desse animal há presença também de outras espécies domésticas, que poderíamos suspeitar estarem envolvidas no ciclo de transmissão das leishmanioses como o cavalo e o gato (figura 8), assim como já descrito por Madeira et al. (2003)³¹, relatam que a elevada prevalência de LTA em cão e equino em áreas endêmicas, principalmente no Brasil e Venezuela, sugere a participação desses animais na cadeia de transmissão da doença.

Há numerosos registros de ocorrência de LTA em animais domésticos como cães e gatos, como descrito por Araújo-Filho et al., (1978)⁷, e equino⁴.

Em várias partes do mundo já foram encontrados cavalos infectados com *Leishmania infantum*. Dentre elas podemos citar, a Alemanha, a Espanha⁴⁹ e Portugal⁵⁴ o que pode ocorrer também com a leishmaniose tegumentar.

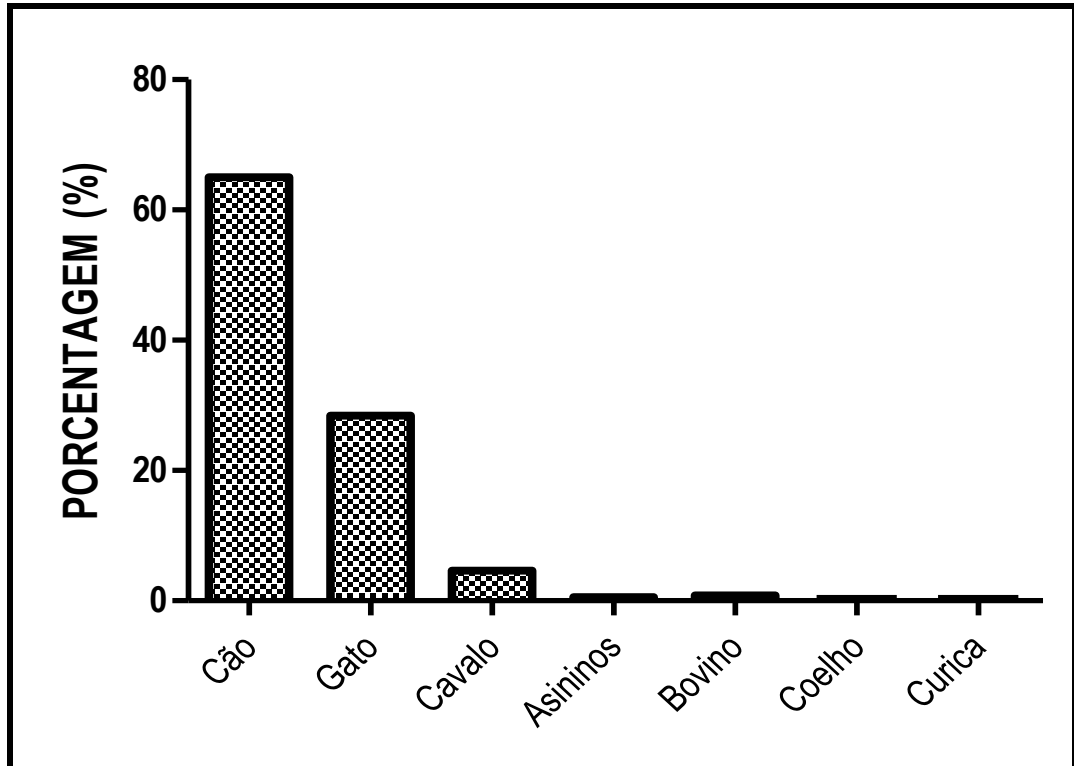


Figura 8. Espécies de animais domésticos presentes nas residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

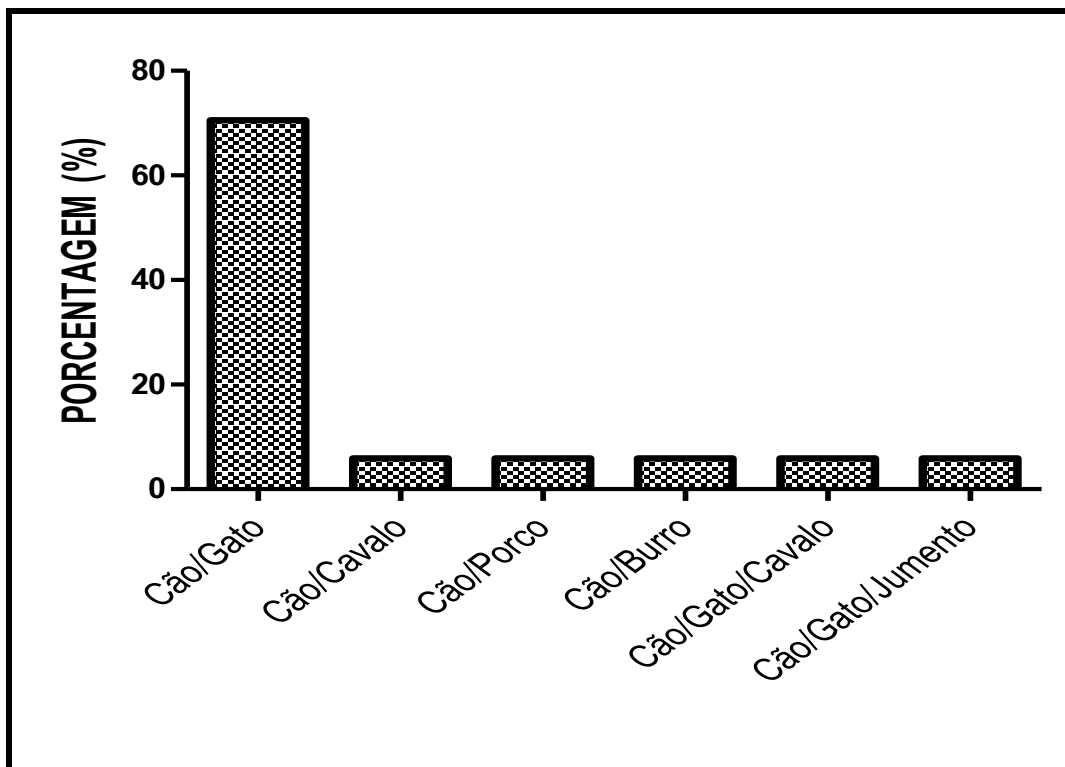


Figura 9. Espécies de animais domésticos concomitantes presentes nas residências do bairro Santa Teresa, Teresina, PI.

Além dos cães domiciliados pode-se perceber a presença de cães de rua, contribuindo para aumentar o número de reservatórios domésticos (figura 10). Segundo Moreno e Alvar (2002)³⁵, o cão participa do ciclo de transmissão tanto domiciliar quanto peridomiciliar. Outro ponto importante é que os cães infectados não necessariamente desenvolverão sinais clínicos, pois alguns conseguem controlar o parasito e, conseqüentemente, não evoluem para a doença durante anos ou mesmo durante toda a vida, mantendo-se assintomáticos e como fonte de infecção.

A ocorrência de casos de LTA no peridomicílio está associada à presença de animais domésticos e roedores que podem ser reservatórios do parasito. Mais de 40 espécies de mamíferos silvestres do Novo Mundo já foram encontradas parasitadas pela *L. braziliensis*³².

Deve-se considerar também a existência do hospedeiro acidental. Embora ele não desempenhe um papel significativo na epidemiologia das leishmanioses, a sua importância não deve ser desconsiderada, pois além de poder introduzir ou reintroduzir a infecção em novas áreas servem, também, como fonte de alimentação para os vetores. O cavalo Alvarenga, (1988)³ e o gato⁴⁴ têm sido referidos como hospedeiros acidentais. Entretanto, tem-se sugerido a hipótese do gato desempenhar um papel de reservatório habitual⁴⁹.

Na Europa, foram descritos casos de leishmaniose cutânea causada por *L. infantum* em equinos⁴⁹. Na América do Sul foi descrito um caso de LTA em equino ocasionado pela *L. braziliensis*, o qual tem sido proposto como reservatório do agente causador da leishmaniose cutânea humana causada por esta espécie⁵⁰.

Foi verificado que na área pesquisada os equinos frequentemente estão presentes no peridomicílio de várias moradias. Assim sendo, poderíamos sugerir que esses animais, embora com menor relevância que os caninos, poderiam se transformar em mais um hospedeiro para esta antroponose, assim como foi sugerido em estudos com equinos no Rio de Janeiro por Duarte et al., (2001)²¹, tanto da forma tegumentar quanto visceral.



Figura 10. Reservatórios domésticos das leishmânias no peridomicílio das residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Em 87,62% das residências não há abastecimento de água pelo sistema oficial, sendo que 79% obtém água de poço tubular. O sistema de esgoto predominante é do tipo fossa séptica que está presente em 70,48% das residências visitadas, e em 16,2% não há nenhum sistema de fossa séptica, sendo que as necessidades fisiológicas são realizadas a céu aberto. (figuras 11 e 12). A localização das residências ao distanciamento das matas, quase 90% estão localizadas a menos de 500m da mata (figuras 13 e 14).

O descarte de resíduos sólidos em terrenos baldios e logradouros, e ausência de esgotamento sanitário e banheiro, podem criar condições para o desenvolvimento do vetor das leishmanioses, tanto em ambientes domiciliar quanto peridomiciliar, em função do acúmulo de matéria orgânica e umidade nessas áreas⁴⁹. A presença do lixo pode atrair possíveis reservatórios da LTA, como pequenos mamíferos para o ambiente peridomiciliar⁹. Outro fator a se considerar é que a falta de instalações sanitárias propicia para que as pessoas, principalmente em áreas rurais, se desloquem para ambientes florestais para fazer suas necessidades, levando-os a exposição aos vetores da LTA⁴⁵.

A inexistência de saneamento básico e educação favorecem o surgimento constante de novas formas de expressão de doenças já conhecidas anteriormente e a emergência de novas, sobretudo as doenças parasitárias que representam um grave problema de saúde pública nos países pobres e em desenvolvimento⁸.

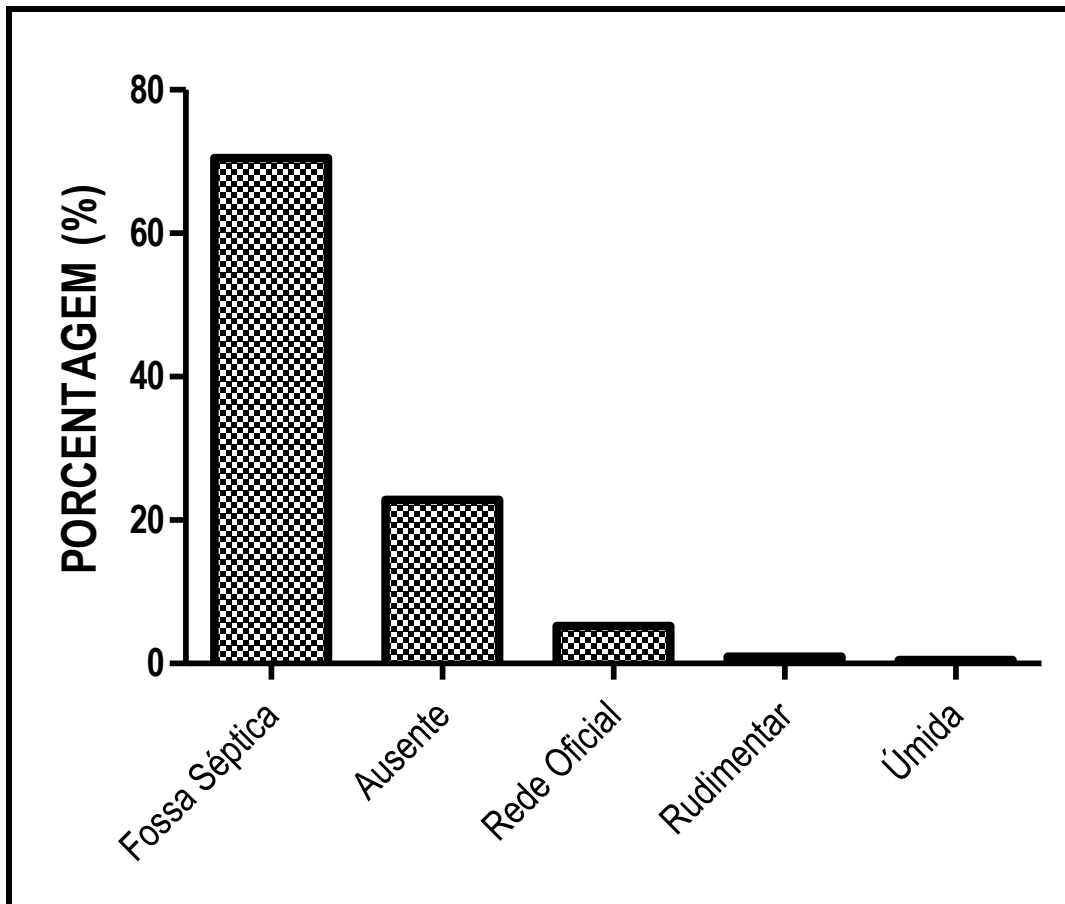


Figura 11. Sistema de esgoto das residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.



Figura 12. Tipo de banheiros em residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

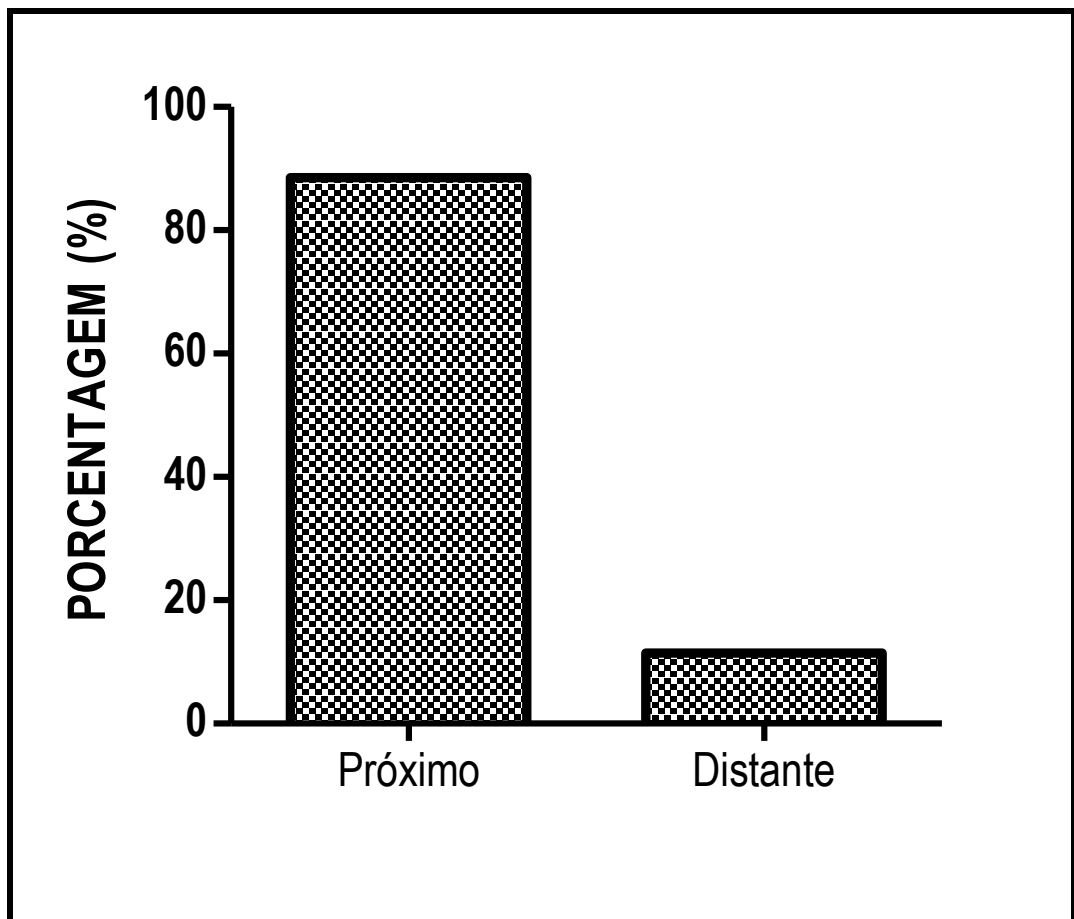


Figura 13. Distância das residências em relação à mata no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Para fins desta pesquisa considerou-se como residência próxima à mata a que se localiza a uma distância de até 500m da vegetação e, superior a essa distância foi considerado como distante.

Mais de 80% das residências visitadas estão localizadas próximas às matas (figuras 15 e 16). Reis et al. (2011)⁴⁴ afirmam que a proximidade das florestas e das matas constituem um dos principais fatores de risco para a ocorrência de LTA, sendo que esses focos se encontram, em sua maioria, em pequenas populações¹⁰, o que corrobora com nossos resultados, assim como os dados obtidos na Venezuela por Feliciangeli et al. (2006)²² que demonstrou que indivíduos infectados residiam entre 10 e 117 metros de áreas florestais.



Figura 14. Residência localizada dentro da mata no bairro Santa Teresa, Teresina/PI, demonstrando as condições precárias e de total inexistência de banheiro com instalações sanitárias básicas.

Todas essas condições, em maior ou menor grau, estão presentes na área de estudo de Santa Teresa. A comunidade, pela simplicidade determinada pela baixa escolaridade, baixo poder aquisitivo e pouca assistência social, são forçadas a se adaptarem a essas condições, ficando a mercê de muitos patógenos que predisõem o organismo a contrair enfermidades, dentre elas a LTA.

A presença de anexos com fins criatórios nas residências, como galinheiro (figuras 17 e 18) e chiqueiro foi observada em aproximadamente 60% das residências. Esses anexos representam um importante fator que propicia a adaptação do vetor da leishmânia ao ambiente peridomiciliar e também

intradomiciliar³³. As aves são fontes de alimentos para o inseto vetor, acarretando um maior contato deste com os cães e humanos. Por outro lado, galinhas atraem animais silvestres carnívoros, que são também reservatórios para leishmânia⁴⁰. Os anexos de animais domésticos criam condições favoráveis para o desenvolvimento de insetos vetores no peridomicílio¹



Figura 15. Residência localizada próximo à área de morros no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

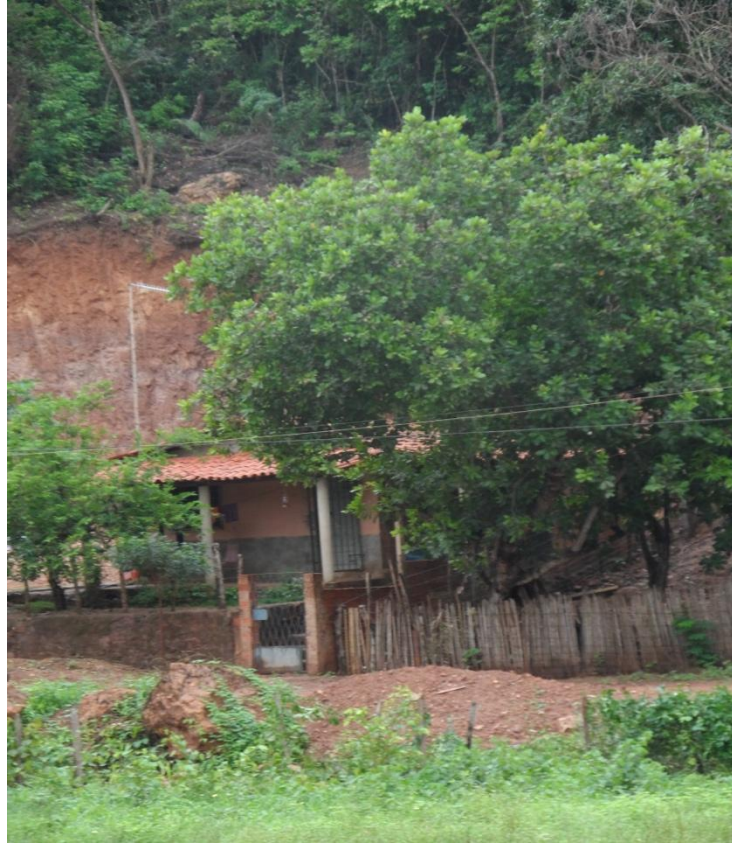


Figura 16. Residência localizada próximo à área de morros no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

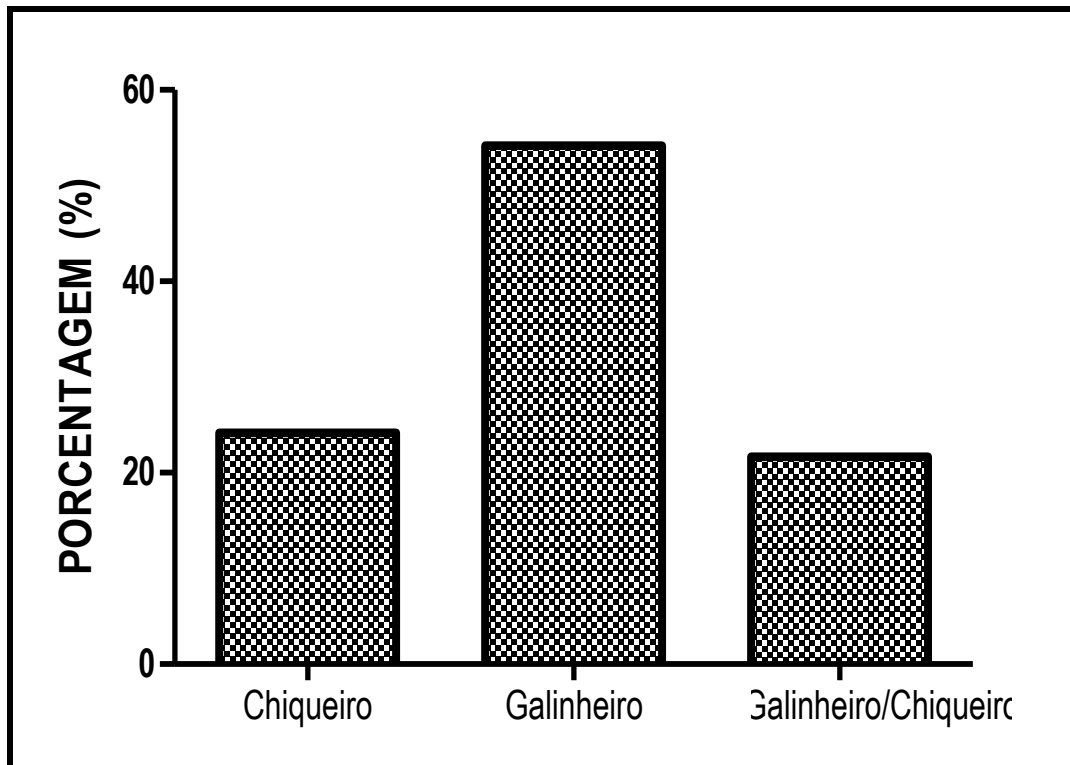


Figura 17. Tipos de anexos presentes nas residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

A epidemiologia da LTA é influenciada também por alterações de uso e cobertura do solo e pela deterioração dos ecossistemas com o aumento das áreas de agricultura e pecuária. Essas alterações causam mudanças no ciclo do vetor da doença que passa a habitar o peridomicílio⁹.

Na área em estudo 5,7% dos moradores utilizam o solo para a agricultura e, aproximadamente, 36% residem em meio à vegetação nativa. O desmatamento para utilização do solo na agricultura é um fator que influi na ocorrência de surtos endêmicos podendo ocorrer em áreas de colonização antiga associada às formas de ocupação do espaço, particularmente no espaço rural, embora também ocorra em áreas urbanas conforme afirmam Negrão e Ferreira (2009)³⁷.



Figura 18. Anexo (galinheiros) presente em residência no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

A disposição das residências no bairro é bastante diversificada (figura 19) sendo que a maioria situa-se em áreas de baixada seguida de área alta (figura 20). A ocorrência de LTA é principalmente em zonas com altitudes inferior a 800m com relação ao nível do mar, em zonas com densa vegetação, situada em áreas próximas a zonas montanhosas⁸. A cidade de Teresina está localizada a uma altitude de 72m acima do nível do mar²⁵ favorecendo a ocorrência da doença.

Associado a este fato a região estudada apresenta elevada umidade e extensas áreas de vegetação nativa (figura 21) e de morro, observa-se também residências localizadas em meio a esta vegetação (figura 22), caracterizando assim a ocorrência do ciclo silvestre da LTA na região em estudo. Lonardoní et al., (2006)²⁹ caracterizam o ciclo silvestre da LTA como sendo aquele em que a transmissão ocorre em áreas de vegetação primária, o que está de acordo com nossos achados.

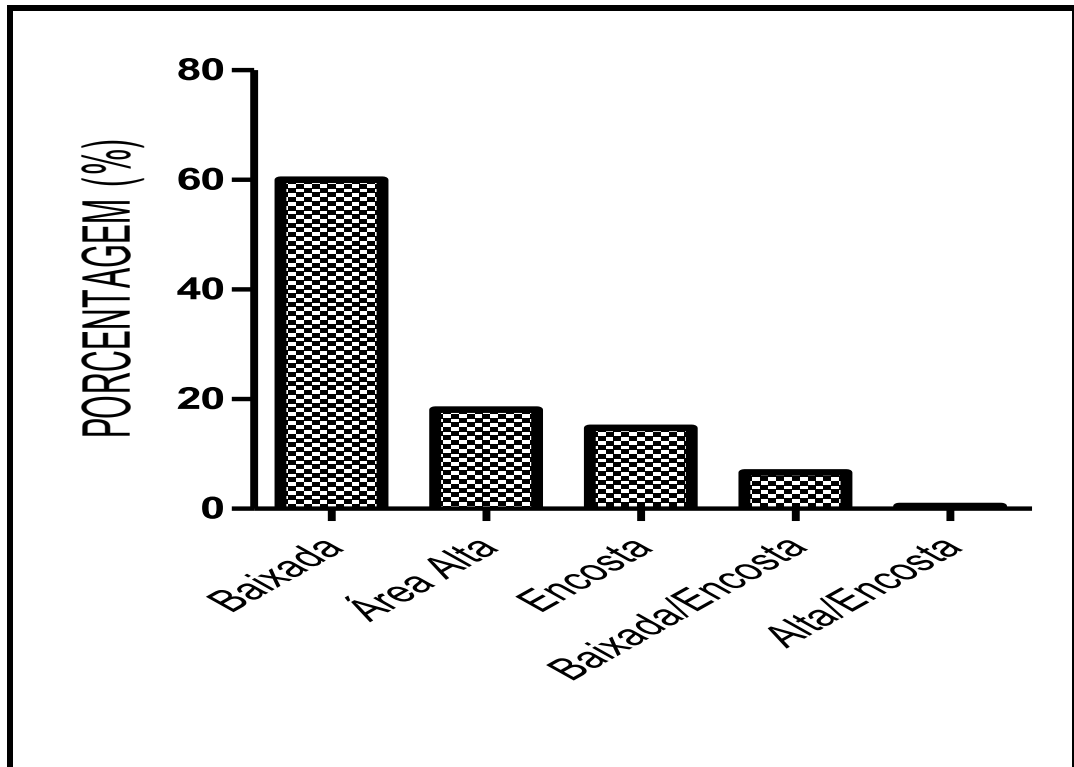


Figura 19. Aspectos topográficos do bairro Santa Teresina, Teresina/PI.



Figura 20. Residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI, localizadas em áreas alta e baixa.

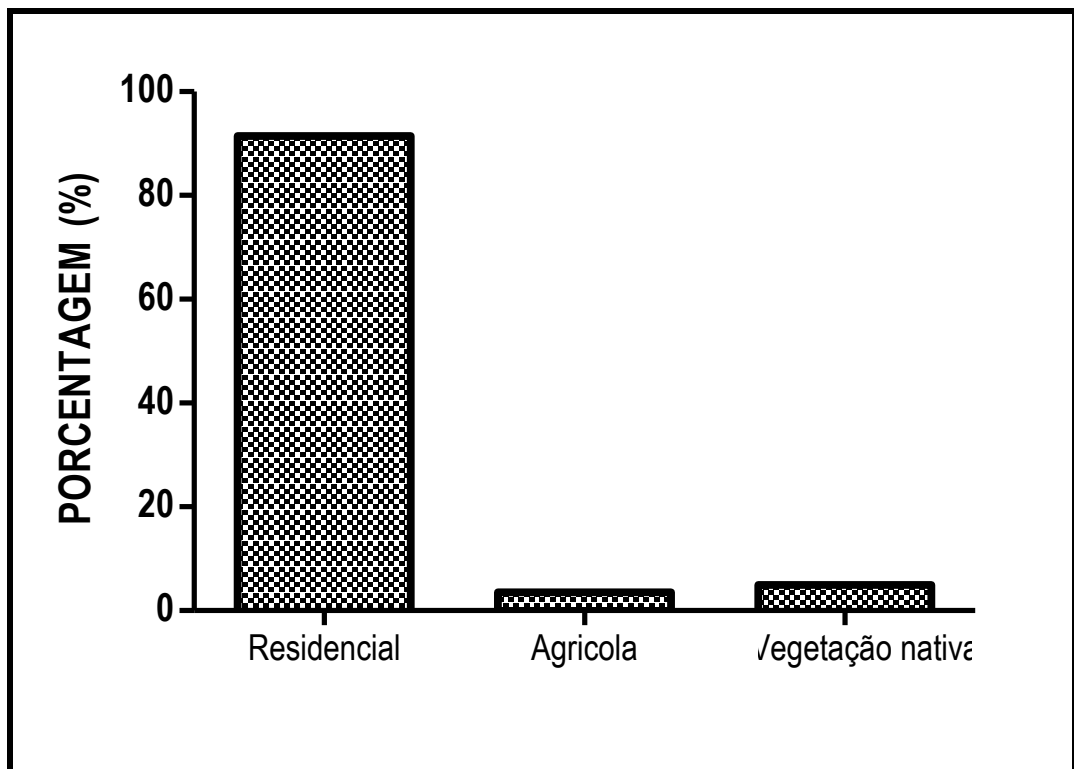


Figura 21. Forma de uso do solo no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.



Figura 22. Residência localizada em meio a vegetação nativa no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Observamos com elevada frequência o acúmulo de lixo em diversas áreas do bairro Santa Teresa, pois em 40% desta região não há coleta do lixo. A ocorrência desses “depósitos” de lixo constitui mais um fator que favorece o aumento da população de roedores e insetos. A proliferação de roedores e insetos associado à situação econômica precária contribuem de forma significativa para a disseminação da LTA, caracterizando o perfil de transmissão periurbano e rural⁹.

Apesar das condições socioeconômicas e sanitárias do bairro serem desfavoráveis, mais de 60% dos moradores consideram o estado de saúde da família boa, e os demais consideram regular e ruim, apresentando diversas doenças (tabela 1). Doenças crônicas foram as mais relatadas pelos moradores visitados, essas patologias surgem à medida que a população envelhece⁴¹.

Tabela 1. Tipos de doenças presentes entre os moradores do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Doenças	Porcentagens
CARDIOVASCULAR	40,66%
NEOPLASIA	9,12%
DIABETES	8,47%
ARTRITE	6,76%
PROBLEMA RESPIRATORIO	5,07%
PROBLEMA NEUROLOGICO	5,07%
HERNIA DE DISCO	3,38%
GASTRITE	3,38%
OSTEOPOROSE	3,38%
ANEMIA	3,38%
MICOSE	1,69%
LTA	1,69%
HIPERTENSÃO/DIABETICO	1,69%
OSTEOPOROSE/HIPOTIROIDISMO	1,69%
SEM DIAGNÓSTICO	1,69%

Para fins deste estudo, a determinação da densidade residencial da área foi estimada como sendo baixa a que as residências distam entre si mais de 5m; regular em torno de 5m e elevada as que distam menos de 5m entre si, desde que houvesse edificações em ambos os lados da rua.

A densidade residencial na área estudada (figura 25) é predominantemente regular, superior a 60%, seguida de densidade baixa, de aproximadamente 30% (figura 26). Nas áreas peridomiciliares normalmente há presença de vegetação do tipo floresta, acúmulo de lixo e de animais domésticos como caninos, aves, suínos e equídeos, os quais eliminam seus dejetos nestas áreas. Além desses fatores, há também falta de rede de esgoto sanitário, acúmulo de água nas ruas e em áreas de mata, contribuindo efetivamente para a proliferação de insetos, inclusive o vetor das leishmanioses e de outras doenças infectocontagiosas. Os moradores entrevistados não relataram ocorrência de doenças infecciosas e parasitárias, tal fato pode ser justificado pelo curso relativamente curto de algumas dessas doenças durante o período da pesquisa e/ou pela ausência sinais clínicos e sintomas nesse período.

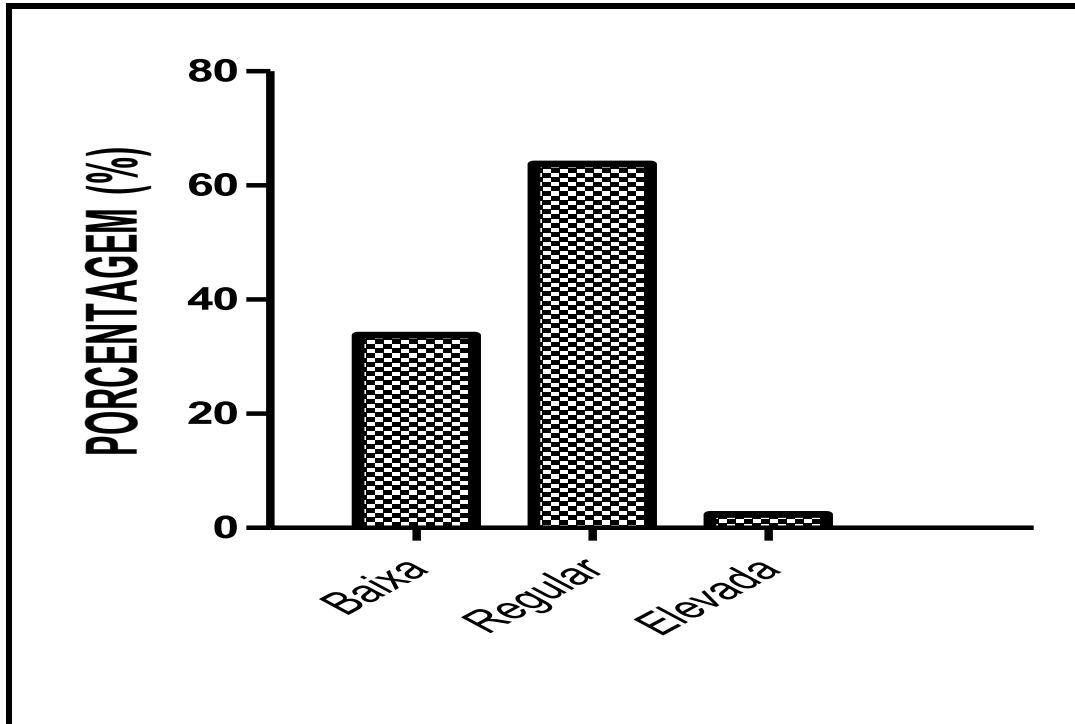


Figura 23. Densidade residencial do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.



Figura 24. Densidade residencial no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

As residências foram divididas em três grupos, tendo como critério características estruturais: precárias, semiprecárias e boas. Precárias são as construídas de pau a pique ou de tijolos sem reboco, com cobertura de palha, desprovida de piso impermeabilizado e sem instalações sanitárias adequadas; semiprecárias são as que apresentam piso impermeabilizado, paredes rebocadas,

mas com cobertura de palha e sem instalações sanitárias adequadas; e as boas são construídas de tijolos, rebocadas, com piso impermeabilizado e com instalações sanitárias adequadas. Instalações sanitárias adequadas, para fins desse estudo, são aquelas providas de fossas sépticas e banheiro com piso e revestimento impermeabilizados.

Aproximadamente 40% das residências são edificações semiprecárias e precárias (figura 27), e em aproximadamente 60% são edificações de boa qualidade. As residências precárias e semiprecárias (figura 28) se interpõem entre as de boas condições e, entre elas, foi observado extensas áreas de vegetação primária.

Não foi verificada pavimentação em quase 60% do bairro (figuras 29 e 30), verificando também áreas com elevada umidade, acúmulo de lixo (figura 31) e matéria orgânica em decomposição, além da presença de animais doméstico (cães, gatos, galinhas e equídeos), e também relatado a presença de animais silvestres circulando pelas ruas e peridomicílio.

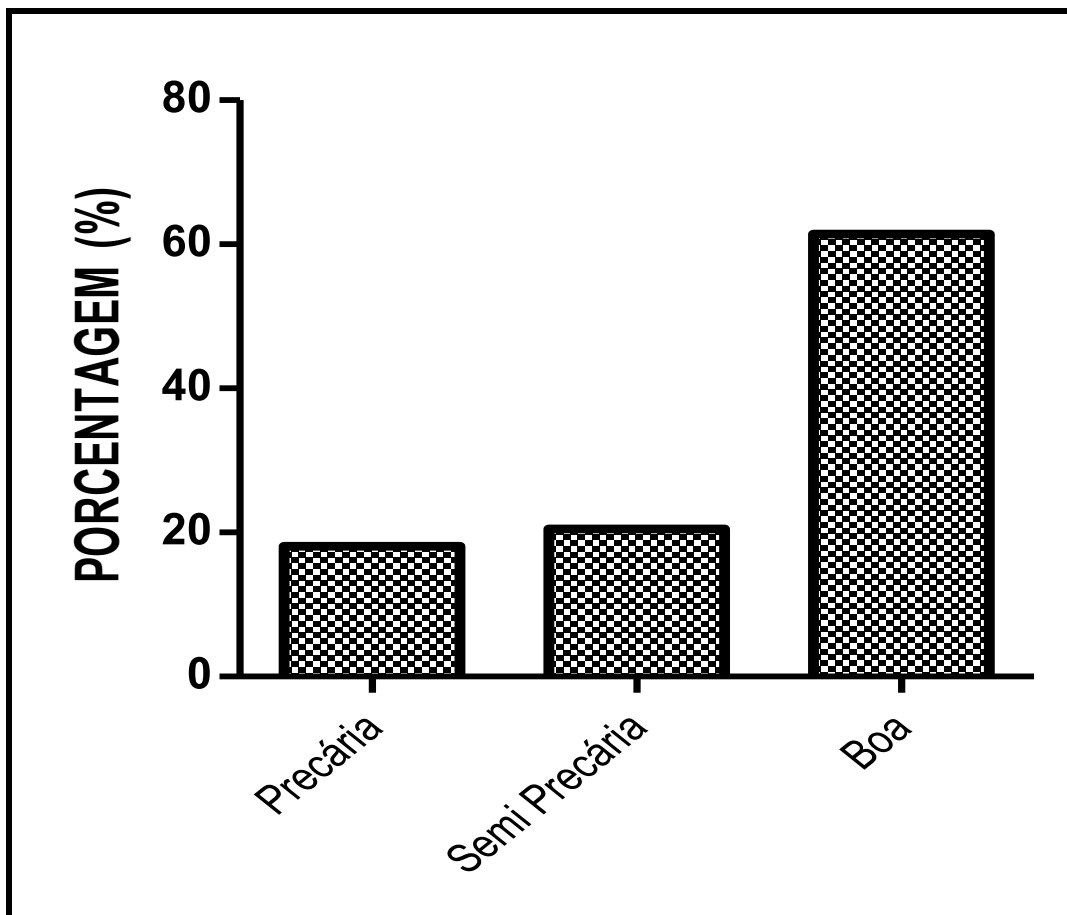


Figura 25. Condições das residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.



Figura 26. Condições precárias de residências do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

As leishmanioses têm uma forte ligação à pobreza e, conseqüentemente, a condições de saúde e alojamento precárias e à má nutrição² como pode ser verificado na área pesquisada.

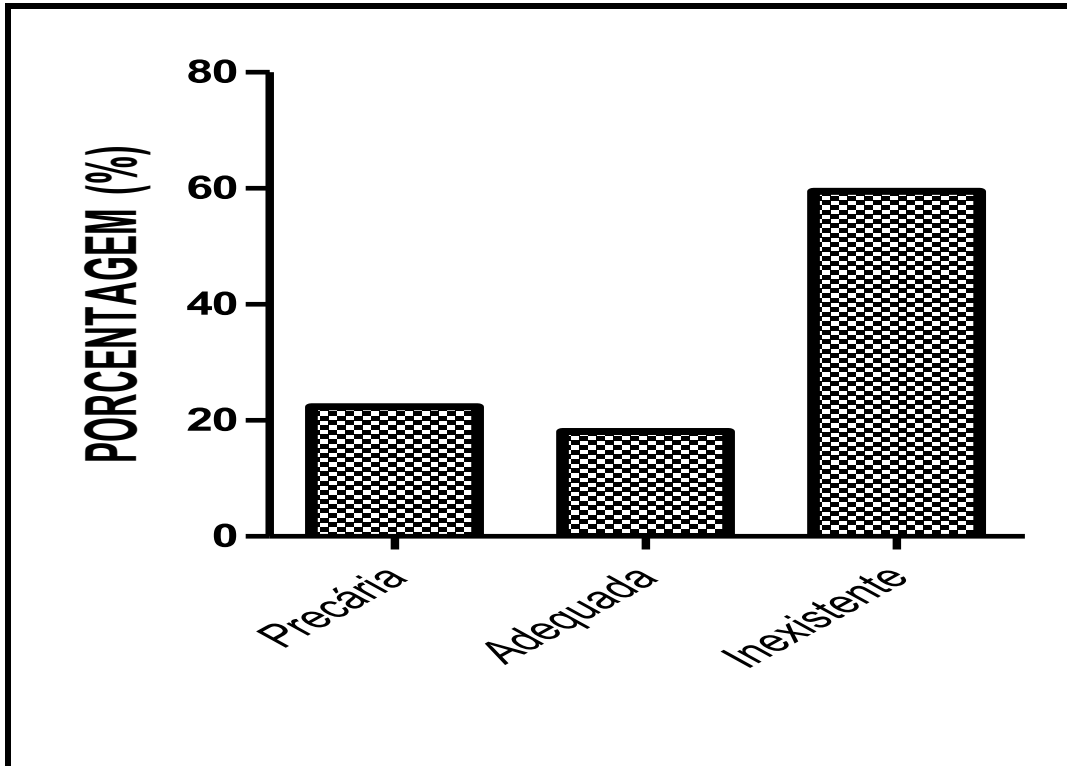


Figura 27. Condições de pavimentação do bairro Santa Teresa, Teresina/PI.



Figura 28. Rua do bairro Santa Teresa, Teresina/PI, com pavimentação precária e ausente.



Figura 29. Acúmulo de lixo no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Os agentes de transmissão da LTA representam importante elemento do seu ciclo, que são as diferentes espécies de flebotomíneos, podendo ser encontrados em diversos locais, variando de acordo com fatores ambientais³⁹. Aguilar e Medeiros (2003)¹ relatam que regiões que apresentam alterações bruscas do clima os afugentam em decorrência da sua fragilidade orgânica, assim buscam abrigos em locais úmidos, sem luminosidade, com baixa corrente de ar e com matéria orgânica em decomposição, conforme foi observado na área estudada (figura 31), sendo a umidade um fator determinante na manutenção destes insetos os quais são encontrados em abrigos como troncos de árvores, tocas de tatu, folhas caídas no solo, grutas, fendas nas rochas, anexos com fins criatórios para animais domésticos e até nas paredes externas e internas dos domicílios¹.



Figura 30. Áreas com umidade, baixa luminosidade, acúmulo de matéria orgânica propícia ao desenvolvimento de flebotomíneos no bairro Santa Teresa, Teresina/PI.

Para um maior entendimento sobre a epidemiologia da doença e também para adoção de medidas de prevenção e controle são realizadas identificação das espécies de vetores, assim como a estimativa das taxas de infecção natural pelas diferentes espécies de *Leishmania* presentes em área endêmica para leishmanioses¹⁶.

Buscando identificação de espécies de vetores de leishmânia presentes no bairro Santa Teresa, foram colocadas nove armadilhas em quatro residências em que houve casos de LTA, sendo que em três delas foram instaladas duas armadilhas uma no intradomicílio e outra no peridomicílio num raio de 3m. Em uma das residências em função da presença de um lixão a uma distância aproximada de 4m do domicílio, foi colocada uma terceira armadilha nessa área. Foram capturados 1317 insetos de diferentes espécies, destes 907 eram flebotomíneos sendo 297 fêmeas e 610 machos.

Dos insetos fêmeas capturados nas armadilhas foram selecionadas ao acaso 99 para pesquisa de DNA de leishmânia e realização de “nested” PCR ITS’1. A biologia molecular baseada na PCR é um método bastante utilizado em estudos para detecção de infecção natural de *Leishmania* spp, pois apresenta elevada

sensibilidade e especificidade da identificação, independente de número, estágio e localização do parasito no vetor⁴².

A análise dos flebotomíneos capturados na região estudada, revelou que todos pertenciam à espécie *Lutzomyia longipalpis*. Apesar de se tratar de uma área endêmica para LTA, não é comum a captura de outras espécies de vetores da leishmaniose (CCZ, 2011)¹⁷. No ano de 2013 a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA)²³ capturou 8.887 flebotomíneos em diversas áreas em que ocorreram casos autóctones de LVA e LTA, sendo encontradas 98% da espécie *Lu. longipalpis*, fato semelhante tem ocorrido em Teresina de acordo com os relatórios de CCZ, sugerindo a participação dessa espécie na cadeia de transmissão da LTA.

Foram realizadas “nested” PCR, de 99 *Lu. longipalpis*, sendo que 52 amostras foram positivas para DNA de leishmânia. As amostras positivas para leishmânia, foram submetidas a digestão com enzima de restrição Hae III. A digestão permitiu identificação de sequências de DNA de *Leishmania (Leishmania) infantum* (figura 33) em todas as amostras. Esses resultados estão fundamentados na identificação de espécies de leishmânias por digestão do produto da PCR com enzima de restrição *HaeIII* para a região ITS1⁴⁷. Neste estudo o índice de infecção do vetor por *Leishmania (Leishmania) infantum* na espécie *Lutzomyia longipalpis* foi de 52,5%, índice semelhante foi encontrado em estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro por PCR multiplex seguido de hibridização, com índice de 60% de positividade para *Leishmania (Viannia) spp.* em *Lutzomyia whitmani*.

O diagnóstico da infecção natural de flebotomíneos por biologia molecular vem substituindo a técnica por dissecação, pois este é um procedimento laborioso que requer extrema habilidade técnica, além disso, outro fato importante, é que em locais onde a presença do parasito é escassa, este procedimento pode fornecer resultados falso-negativos, revelando índices baixíssimos de infecção o que é incompatível com a realidade⁴³, uma vez que a incidência da doença continua elevada, assim este método de determinação da infectividade dos flebotomíneos demonstrando tão baixa positividade de infecção por *Leishmania spp*³⁰, dificulta os programas de controle e profilaxia da doença.

O elevado índice de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania (Leishmania) infantum* pode estar relacionado ao fato da identificação ter sido realizada por “nested” PCR que é uma técnica mais sensível do que a dissecação do

inseto vetor seguida de microscopia³⁶. Outro fator que pode ter contribuído é o tamanho da amostra.

A principal espécie de flebotomíneo associada à transmissão de LVA no Brasil é *L. longipalpis*, com distribuição abrangente, coincidente com os focos da doença, hábito alimentar eclético, antropofílico, e há comprovação de infecção tanto natural quanto experimental²⁷. Enquanto que as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão de LTA são: *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. Whitmani*; *Lu. flaviscutellata* e a *Lu. olmeca*¹⁵.

Apesar da presença da LTA na área deste estudo, não foram encontradas nenhuma das espécies que causam e participam da transmissão da doença com mais frequência no Brasil. Esses resultados são de difícil esclarecimento, porém pode estar relacionado ao período em que foi realizada a coleta dos flebotomíneos, ao número de flebotomíneos capturados e a localização, disposição e altura de instalação das armadilhas de captura. Esses dados permitem sugerir efetivamente um possível envolvimento da espécie *L. longipalpis* no ciclo de transmissão da LTA na região estudada, considerando que foi a única espécie de flebotomíneo capturada. Os achados de 98% dessa espécie pela FUNASA²³ no ano de 2013, em áreas de surtos endêmicos no Estado do Piauí, corroboram com essa suposição.



Figura 31. Análise dos produtos de digestão da PCR com enzima de restrição Hae III para a região ITS1 de *Leishmania* em *Lutzomia longipalpis* em gel de agarose a 3%. Linhas 1, 2, 9 e 11, 13 e 14 representam fragmentos específicos para *Leishmania (Leishmania) infantum*. A 123 bp ladder foi usado como marcador molecular.

Estudos sobre vetores de leishmânias sugerem que para haver mais de uma espécie numa comunidade local, é necessário que todas as espécies estejam adaptadas às condições e recursos disponíveis e, também, às interações competitivas interespecíficas. Espécies filogeneticamente muito próximas normalmente utilizam os mesmos recursos ecológicos e, conseqüentemente ocorre competição interespecífica, levando a eliminação de uma delas⁶. Esse fato pode ser uma das justificativas para nossos achados.

4 - CONCLUSÃO

As características topográficas e ecológicas do bairro Santa Teresa são favoráveis à ocorrência de LTA;

As condições socioeconômicas associadas à falta de saneamento básico e à elevada população de animais domésticos e silvestres reservatórios, criam condições satisfatórias para o desenvolvimento de agentes infecciosos e parasitários, sobretudo a *Leishmania*.

A endemia de LTA na região é do tipo silvestre modificada.

Todos os flebotomíneos positivos estavam infectados por *Leishmania (L.) infantum*.

A existência apenas de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* sugere sua participação no ciclo de transmissão de LTA na região.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguiar, G. M.; Medeiros, W. M.. Distribuição regional de habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. p. 207-256. *In*: Rangel E. F. & R. Lainson (Org.) Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.
2. Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C., Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 22: 552-7. 2006.
3. Alvarenga-Yoshida et al., Infecção natural de *Equus caballus* por *Leishmania* sp, SP, Brasil. p. 78-80. *Revista Inst. med. trop. São Paulo* 1988.
4. Alves, E. B., Fatores de risco para incidência de infecção por *Leishmania infantum* na cidade de Teresina, Piauí/ Erika Barretto Alves. –Rio de Janeiro: UFRJ/ Instituto de Estudos em Saúde Coletiva, Dissertação de mestrado. 53f 2012.
5. Andrade, A. R. O.; Dorva, M. E. M. C.; Andrade, S. M. O.; Marques, A.; Silva, B. A. K.; Andreotti, R. Phlebotominefauna in the PontaPorã city: epidemiological importance in border line between Brazil and Paraguay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, Hong Kong, v. 2, n. 5, p. 362–366, 2012.
6. Araújo-Filho, N. A.; Coura, R. J.; Reis, V. L. P. Leishmaniose tegumentar americana na ilha grande, Rio de Janeiro. iv. reservatórios domésticos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Vol. XIV – N^{os} 4 – 6, p. 163-169, 1978
7. Ault, S. K. Pan American Health Organization's Regional Strategic Framework for addressing neglected diseases in neglected populations in Latin America and the Caribbean. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Sep 18, 2007.
8. Bonfante-Garrido R 1983. Leishmanias y leishmaniasis tegumentaria en America Latina. *Bol OfSanit Panam* 95: 418-424.

9. Bosano, S.A.I.; Camargo, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: Historico, Epidemiologia e perspectiva de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, p. 328-337, 2004.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. Ed. Brasília, 179p. 2007.
11. Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. SAÚDE, M. D. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 1: 120 p. 2006.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica (GVE). 6. ed. Brasília; Ministério da Saúde, 2005.
13. Brasil: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar) normas técnicas. Brasília, 85p. 1996.
14. Camargo-Neves, V. L. F. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil. São Paulo - SP, 2004. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2004.
15. Carvalho, G. M. L. et al. Naturally infected *Lutzomyia* sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*, New York, v. 8, p. 407-414, 2008.
16. Centro de Controle de Zoonose – CCZ, Relatório anual de captura de flebotomíneos, 2012.
17. Costa, J. M. L. "Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil", *Gazeta Médica da Bahia*, 75, p.3-17. 2005.

18. Curti, M. C.M et al., Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2009;30(1):63-68.
19. Dantas-Torres, F.; Solano-Gallego, L.; Baneth, G.; Ribeiro, V. M.; Cavalcanti, M. P.; Otranto, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. Trends in Parasitology, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.
20. Duarte, R. et al; Sorologia para leishmaniose em equino no município do Rio de Janeiro. I Boletim de divulgação técnica e científica, v.4, p.8, 2001.
21. Feliciangeli, M. D. et al. Leishmania and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in west central Venezuela. Tropical Medicine & International Health, v. 11, n. 12, p. 1785-1791, 2006.
22. Fundação Nacional de Saúde-PI – FUNASA-PI, Relatório Anual de Captura de flebotomíneos em área com transmissão de casos autóctones de Leishmanioses Visceral e Tegumentar no estado do Piauí - Brasil, 2013
23. Google Earth, Disponível em <https://www.google.com/earth/>. Acesso em 20/02/2014
24. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo demográfico 2010. Disponível:
<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/webservice/default.php?cod1=2&cod2=&cod3=2&frm=cartogramas>. Acesso: 24/07/2012.
25. Killick-Kendrick R., Rioux J.A. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus arsiensis*. Parasitology, 44: 67-71, 2007.

26. Lainson R. Epidemiologia e ecologia de leishmaniose tegumentar na Amazônia. *Hiléia Médica*, 3:35-40, 1981.
27. Lima, H. D.; Guglielmo, Z. D.; Rodríguez, A.; Convit, J.; Rodriguez N. Cotton Rats (*Sigmodon hispidus*) and Black Rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97(2), p. 169-74, 2002.
28. Lonardoní, M. V. C.; Silveira, T. G. V.; Alves, W. A.; Elkhoury, A. N. S.; Lythgoe, K.A. The coevolution of parasites with host-acquired immunity and the evolution of sex. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 54: 1142. 2006.
29. Luz, E. et al. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Liverpool, v. 94, n. 6, p. 623-631, 2000
30. Madeira, M.F.; Uchôa, C.M.A.; Leal, C.A. et al., *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, p.551-555, 2003
31. Martins, L. M. et al. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Caderno de Saúde Pública*, v. 20, p. 735-43, 2004.
32. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília, Brasil, 122 p. 2003.
33. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Agravos Notificados (SINAN). Fundação Municipal de Saúde (FMS), Teresina/PI. 2011.
34. Moreno J.; Avar J. Canine leishmaniasis epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18: 399-405, 2002.

35. Nascimento, J. C. et al. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a viscera-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 119-122, 2007.
36. Negrão, G. N.; Ferreira, M.E.M.C. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar nas Américas. *Revista Percurso*, v.1, n.1, Maringá, p 85 a 103, 2009.
37. Oliveira, C. C. G., et al. Changing epidemiology of American cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Tropica*; 90:155-62. 2004.
38. Oliveira, G. M. G.; Figueiró Filho, E. A.; Andrade, G. M. C.; Araújo, L. A.; Cunha, R. V. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de Leishmaniose Visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, Ananindeua, v. 1, n. 3, p. 83-94, 2010.
39. OMS, "First WHO report on neglected tropical diseases", 2010. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO_HTM_NTD_2010.2_eng.pdf (acessado em 31/03/2013)
40. Passos, L. N. Avaliação da Reação em cadeia de Polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil. 144 f. Tese de Doutorado em Ciências – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. .2003.
41. Perez, J. E. et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene*, London, v. 88, p. 1614, 1994.
42. Pita-Pereira, D. et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil)

- revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 99, n. 12, p. 905-913, 2005.
43. Reis, Homero Ribeiro, et al. Soroprevalencia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) canina e fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Bela Vista do Paraíso, Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.32, n.3, p. 1083-1094, jul/set. 2011.
44. Ribeiro, M. D., Diagnóstico ambiental em saúde: Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Acre. Universidade de Franca. Dissertação de mestrado. 2013. Acesso em outubro de 2013. Disponível em www.unifran.br/site/canais/pos/strictoSensu/tesd/visualizar.php?id
45. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138: 405-425. 2003
46. Shaw, J. J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* Rio de Janeiro, RJ, v. 102, n. 5, p. 541 -547, 2007
47. Solano-Gallego, L.; Rodríguez-Cortés, A.; Iniesta, L.; Quintana, J.; Pastor, J.; Espada, Y.; Portús, M.; Alberola, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *American Journal*, v.. 76, n.4; p. 676-680, 2007.
48. Uchôa C.M.A. et al. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.34, n.6, p.563-568, 2001.
49. Vieira, V.P.; Ferreira, A.L.; Falqueto, A. Pesquisa de criadouros de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar, em área endêmica de leishmaniose tegumentar (LT)

no estado do Espírito Santo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.32, supl. I, p. 31)2, 1999.

50. Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 90: 31-37. 2004
51. World Health Organization – WHO. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html>. Acesso em: 21 nov. 2012. 2008.
52. Ximenes M. F.F.M., Silva V. P. M, Queiroz P. V. S, et al., *Phlebotomine* (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses. *Neotrop Entomol.* 36:128-37. 2007.

1 **CAPÍTULO 2:**
2 **EQUÍDEOS INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) Infantum* NA ÁREA**
3 **ENDÊMICA DE TERESINA, PIAUÍ, BRASIL.**

4

5 Nilton Andrade Magalhães¹, Francisco Humberto da Silva Ribeiro¹; Eláine Gonçalves Oliveira¹, Aline
6 Pereira Martins¹; José Arnaldo de Sá Junior¹; Lucilene Santos Silva; Cristian Francisco de Carvalho
7 Oliveira¹; Maria das Graças Prianti¹; Raniere Madeiros de Carvalho²; Hiro Goto⁴; Francisco Assis
8 Lima Costa^{3*}

9 ¹ Universidade Federal do Piauí, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária,

10 ²Universidade Federal do Piauí, Departamento de Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde.

11 ³Universidade Federal do Piauí, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Prof. DCCV – UFPI
12 (fassisle@gmail.com)

13 ⁴ Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de
14 Soroepidemiologia,

15 *Autor para Correspondência

16 Tel: +55 86 3215-5760

17 Fax: +55 86 3215-5753

18 E-mail: fassisle@gmail.com (Francisco A.L. Costa)

19

20 **Resumo:** Objetivou-se com esse estudo pesquisar infecção natural de equídeos por
21 *Leishmania* sp em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar americana de
22 Teresina, Piauí, Brasil. As leishmanioses são infecções causadas por protozoário
23 hemoflagelado intracelular integrante do gênero *Leishmania*, família
24 Trypanosomatidae e da ordem Kinetoplastida. Clinicamente pode-se observar uma
25 variedade de sinais desde lesões cutâneas até formas viscerotrópicas que é mais
26 grave e potencialmente fatal. Constituem grande problema de saúde pública
27 mundial, com estimativa de 12 milhões de casos em todo mundo e uma incidência

28 de 1,5 a 2 milhões de novos casos anualmente. 25 a 50% de todos os casos de
29 leishmaniose são do tipo visceral. O cão é considerado o principal reservatório
30 doméstico de leishmaniose visceral americana (LVA). No peridomicílio de moradias
31 rurais, os equídeos, embora com menor relevância que os canídeos, podem se
32 transformar em mais um importante hospedeiro para esta antropozoonose. O
33 município de Teresina, Piauí, onde foi realizada a pesquisa, apresentou elevado
34 crescimento populacional nos últimos anos havendo ocupação rápida e
35 desordenada da periferia expondo sua população a extensas áreas cobertas por
36 florestas tropicais e densa vegetação, prováveis locais de multiplicação silvestre das
37 leishmânias e do seu vetor. Coletou-se sangue periférico de 42 equídeos para
38 pesquisa de DNA de leishmânia por “nested” ITS’1 PCR e sua especificação através
39 da digestão do produto da amplificação da “nested” PCR com enzimas de restrição
40 Hae III. Dos 42 equídeos analisados nenhum apresentava sinal clínico sugestivo de
41 qualquer forma de leishmaniose e nem de outras patologias, entretanto 21 (50%)
42 foram PCR positivos para leishmaniose (14 equinos, quatro asininos e três muares).
43 A digestão do produto da “nested” PCR permitiu identificar sequências de DNA de
44 *Leishmania (Leishmania) infantum*, caracterizando a infecção como LVA. Sete
45 produtos de “nested” PCR de sangue de equídeos positivos foram sequenciados.
46 De acordo com a avaliação no site NCBI (National Center for Biotechnology
47 Information), dos fragmentos de DNA sequenciados, cada uma das sequências
48 obtidas são características da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*. A
49 presença de equídeos infectados com *Leishmania (Leishmania) infantun* sugere sua
50 participação no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral em Teresina, Piauí,
51 Brasil.

52 Palavras-chaves: Equídeos; LVA; PCR; Teresina/P

53 **EQUINES INFECTED BY *Leishmania (Leishmania) Infantum* IN THE ENDEMIC**
54 **AREA OF TERESINA, PIAUÍ, BRAZIL.**

55 **Abstract:** The present study aimed to research natural equines infection by
56 *Leishmania* sp in an endemic area of American Tegumentary Leishmaniasis of
57 Teresina, Piauí, Brazil. Leishmaniasis are infections caused by an intracellular
58 hemoflagellate protozoan that makes part of *Leishmania* genus, Trypanosomatidae
59 family of the order Kinetoplastida. Clinically, we can observe a variety of signals
60 since cutaneous injuries to viscerotropic forms that are more serious and potentially
61 fateful. It constitutes a great world public health problem with estimation of 12 million
62 cases all over the world and an incidence of 1,5 to 2 million new cases annually.
63 Twenty-five to fifty percent of all cases of leishmaniasis are visceral. The dog is
64 considered the main domestic reservoir of Visceral American Leishmaniasis (VAL). In
65 the peridomiciliar area of rural residences, equines may transform themselves in one
66 more important reservoir for this antropozoonosis, although with minor relevance
67 than canines. The municipal district of Teresina, Piauí, where the research was held,
68 presented a high population growth in the last years occurring a rapid and
69 disorganized occupation from the suburbs exposing its population to extensive areas
70 covered by tropical forests and dense vegetation, probable places of sylvan
71 multiplication of leishmania and its vector. Peripheral blood from 42 equines was
72 collected for the DNA research of leishmania by means of “nested” ITS’1 PCR and its
73 specification through the digestion of the amplification product of “nested” PCR with
74 restriction enzymes Hae III. Among the 42 equines analyzed, no one presented any
75 clinical sign suggestive of any form of leishmaniasis and no other pathologies;
76 however, 21 (50%) were PCR positives for leishmaniasis (14 equines, 4 donkeys and
77 3 mules). The digestion of the product by “nested” PCR allowed us to identify DNA

78 sequencing of *Leishmania (Leishmania) infantum*, characterizing the infection as
79 AVL. Seven products by “nested” PCR blood of positive equines were sequenced.
80 According to the evaluation in the site NCBI (National Center for Biotechnology
81 Information), from the fragments of the DNA sequencing, each one of the sequences
82 obtained are characteristics of the species *Leishmania (Leishmania) infantum*. The
83 presence of equines infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* suggests its
84 participation in the cycle transmission of visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí,
85 Brasil.

86 Keywords: Equines; AVL; PCR; Teresina/PI

87

88 **Introdução**

89 As Leishmanioses são causadas por uma grande variedade de parasitos
90 intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. São doenças de transmissão
91 vetorial havendo várias espécies e subespécies de dípteros flebotomíneos vetores
92 de *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK; RIOUX, 2002).

93 Nas Américas as leishmânias ocasionam a Leishmaniose Visceral Americana
94 (LVA) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo esta subdividida em
95 cutânea mucosa, cutânea difusa e a cutânea (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

96 Há uma estimativa de prevalência das leishmanioses que seja de
97 aproximadamente 14 milhões de casos e 59 mil óbitos, afetando 88 países (ALVES,
98 2009) sendo que 350 milhões de pessoas estão predispostas a contraí-la. Das áreas
99 afetadas 72 são países que estão em desenvolvimento. A incidência anual da forma
100 tegumentar é estimada entre 1,5 a 2 milhões de casos por ano (WHO, 2010). A
101 ocorrência da forma visceral é estimada em 500.000 casos novos por ano em todo o

102 mundo (GUERIN et al., 2002), dos casos registrados de leishmanioses, 50% a 75%
103 são da forma cutânea (SUNDAR; RAY, 2002).

104 Nas Américas a transmissão é feita por vetores do gênero *Lutzomyia*. No
105 Brasil, o principal vetor da leishmaniose cutânea é *Lutzomia flaviscutellata*, e da
106 forma visceral é a *Lutzomyia longipalpis* (SACKS; KAMHAWI, 2001).

107 Os principais reservatórios que participam do ciclo zoonótico das
108 leishmanioses são canídeos selvagens e cães domésticos, que desempenham
109 importante papel na epidemiologia da doença (GONTIJO; MELO, 2004).

110 O cão é considerado o principal reservatório doméstico da LVA (OPAS, 2009),
111 sendo que um dos principais métodos de controle é a eutanásia deste animal soro
112 positivo. Contudo o que tem se observado, é que a eutanásia de cães
113 sorologicamente positivos não tem alcançado resultados satisfatórios (DANTAS-
114 TORRES et al., 2012), sugerindo a participação de outros animais reservatórios de
115 importância epidemiológica (CERQUEIRA et al., 2003), como a raposa (*Cerdocyon*
116 *thous*), o lobo guará (*Chysocyon brachyurus*), raposinha-do-campo (*Lycalopex*
117 *vetulus*), cachorro-do-mato (*Spheotos venaticus*) e outros mamíferos marsupiais
118 como *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis* (DRUMOND; COSTA, 2011).

119 Duarte et al.,(2001) sugerem que os equinos por serem animais que estão
120 frequentemente presentes no peridomicílio de várias moradias das regiões rurais,
121 poderiam se transformar em mais um importante hospedeiro desta antropozoonose,
122 embora com menor relevância que os caninos.

123 O município de Teresina, capital do Piauí, é uma área endêmica para
124 leishmanioses. No período de 2007 a setembro de 2011, foram registrados 171
125 casos de LTA no município, sendo 148 (86,55%) da forma cutânea e 23 (13,45%) da
126 forma mucosa (SINAN, 2011).

127 No ano de 2011, a maioria dos casos de LTA ocorreu no bairro Santa Teresa
128 (55,55%), uma comunidade rural na zona leste de Teresina, configurando um surto
129 nessa localidade. A área apresenta baixa infraestrutura sanitária, com economia
130 voltada para o setor primário, com elevadas altitudes e residências edificadas tanto
131 nas áreas montanhosas como nas encostas, em meio à vegetação de floresta. Na
132 região existe um grande número de animais domésticos como equídeos, canídeos e
133 felídeos nas residências.

134 Alguns estudos do continente europeu apontam os equinos como provável
135 hospedeiro da leishmaniose tegumentar (SOLANO-GÁLLEGO et al., 2003; ROLÃO
136 et al., 2005) e no Brasil um estudo experimental sugere um provável envolvimento
137 de equídeos no ciclo da LV (CERQUEIRA et al., 2003). Contudo, informações
138 baseadas na infecção natural de equídeos por *Leishmania sp* no Brasil, é
139 extremamente escassa. Em decorrência da elevada incidência de casos de LTA em
140 humanos na área da Grande Santa Teresa do município de Teresina/PI/Brasil, e da
141 escassez de informações sobre a participação dos equídeos na cadeia de
142 transmissão das leishmanioses, é que se propôs realizar este estudo, objetivando
143 pesquisar infecção natural de equídeos por *Leishmania sp* em área endêmica de
144 leishmaniose tegumentar americana de Teresina, Piauí, Brasil.

145

146 **Metodologia**

147 **Local e Período**

148 A pesquisa é um estudo transversal que foi realizado no período de fevereiro
149 a maio de 2012, no município de Teresina /PI, no bairro Santa Teresa, onde ocorreu
150 maior número de casos humanos de LTA no período de 2010 a 2011, sob a forma

151 de surto endêmico, tendo por base os registros do Sistema Nacional de Agravos
152 Notificados (SINAN, 2011) do referido município.

153

154 **Caracterização da Área**

155 O bairro de Santa Teresa está localizada na zona rural leste-sudeste do
156 município, km 11 da PI 113, a 118m de altitude, e 4°58'08.73"S 48°38'.31.77"O
157 (GOOGLE EARTH, 2013), pertencendo ao complexo de localidades que abrange,
158 também, os bairros Santa Rita e Caminho Novo, sendo denominada de "Grande
159 área da Santa Teresa". Atendida pela Equipe 0018 da Unidade Saúde da Família
160 (USF) Santa Teresa, apresentando uma população de 1.848 habitantes (SINAN-
161 FMS, 2011), distribuída em 436 domicílios (CCZ/TERESINA, 2011).

162

163 **População e Amostra**

164 A população de equídeos do município de Teresina, Piauí é de 680 cabeças.
165 Sendo 402 equinos, 186 asininos e 92 muares (IBGE, 2011). Entretanto não há uma
166 caracterização populacional das espécies por área do município. Assim sendo, a
167 amostra populacional para este experimento foi constituída por todos os equídeos do
168 Bairro Santa Teresa, cujos proprietários permitiram realizar a coleta do material, os
169 quais foram informados sobre os objetivos da pesquisa e esclarecimentos conforme
170 recomendações da Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 196/96 e
171 outras informações complementares constantes do Termo de Consentimento Livre e
172 Esclarecido – TCLE (APÊNDICE 2). A amostra populacional constitui de 42
173 equídeos, sendo 31 equinos, sete asininos e quatro muares.

174

175 **Procedimentos Metodológicos**

176 **Coleta de Material**

177 Antes da coleta do sangue, os animais foram submetidos a exame clínico
178 para verificação do estado de saúde geral e observação sobre existência de lesões
179 que fossem sugestivas de leishmaniose. Em seguida foi colhido 4 mL de sangue da
180 veia jugular em tubos para coleta a vácuo com e sem EDTA para obtenção de soro e
181 extração de DNA, respectivamente. Os soros foram acondicionados em tubos de
182 ensaio de 5ml e congelados em freezer no Laboratório de Patologia Veterinária do
183 Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí até o momento de
184 sua utilização.

185

186 **Exames Laboratoriais**

187 **Extração de DNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

188 A extração do DNA do sangue dos equídeos foi realizada no Laboratório de
189 Patologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do
190 Piauí. Inicialmente hemácias foram lisadas com tampão de lise e, em seguida,
191 procedeu-se a extração utilizando-se kit comercial QIAamp DNA mini Kit (Qiagen)
192 seguindo as recomendações do fabricante.

193 As amostras de DNA de sangue dos equídeos foram armazenadas em
194 microtubos de 1,5ml e congeladas a -20°C. A PCR, nested PCR e sua digestão
195 enzimática foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento
196 de Parasitologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - São
197 Paulo - UNESP/IBB - Campus de Botucatu, para pesquisa de infecção por
198 leishmânias e posterior identificação de espécie.

199 Para realização da “nested” PCR ITS’1 (ribossomal internal transcribed spacer
200 1) foram utilizadas placas (Applied Biosystems) com 4 µL(15ng/µL) de DNA, dois
201 pares de oligonucleotídeos iniciadores (primers). Na primeira fase da reação, que
202 amplificou parte do gene ssu rDNA, utilizando os seguintes primers: R221- 5’
203 GGTTCCCTTTCCTGATTTACG 3’; e R332- 5’ GGCCGGTAAAGGCCGAATAG 3’, e
204 na segunda reação os primers utilizados para amplificação foram 5.8S rRNA: LITSR-
205 5’_ CTGGATCATTTTCCGATG 3’ e L5.8S- 5’ TGATACCACTTATCGCACTT 3’,
206 conforme descrito por Schönian et al, (2003).

207 A reação da PCR foi preparada com 12,5 µL de Go-taq (Promega), 1,0 µL de cada
208 primer e 5,5 µL de água bidestilada conforme instruções do fabricante. A
209 amplificação foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient),
210 com um ciclo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de 30 segundos a
211 95°C, 30 segundos a 53°C, 1 minuto a 72°C e 10 segundos a 72°C. O produto da
212 “nested” PCR ITS’1 foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado
213 em gel red (2µg/ml) e visualizado em Transluminador UV (Bioagency). Após a
214 obtenção dos produtos de amplificação, com aproximadamente 603 bp para a
215 primeira reação e entre 300 a 350 bp para a segunda reação. Foi realizada digestão
216 dos produtos da PCR (10 µL) com enzima de restrição HaeIII, seguindo as
217 recomendações do fabricante (Hybaid GmbH Heidelberg, Alemanha). A reação de
218 digestão foi preparada com 7,3 µL de água bidestilada, 2 µL de tampão de reação
219 10X, 0,2 µL de Bovine Serum Albumin (BSA), 10 µL do produto de PCR e 0,5 µL da
220 enzima de restrição, incubando-se a 37°C por uma hora. Como controle positivo foi
221 utilizado produto de PCR de DNA extraído de cultura de promastigota de
222 *Leishmania*, e como controle negativo foi utilizado água bidestilada.

223 Os fragmentos de restrição foram analisados em gel de agarose a 3%,
224 corados em gel red, visualizado em Transluminador UV e realizado a identificação
225 das espécies de leishmânias seguindo os parâmetros estabelecidos por Schönian et
226 al. (2003).

227

228 **Sequenciamento dos fragmentos amplificados**

229 Foram sequenciados fragmentos de DNA, provenientes de produtos
230 amplificados a partir das amostras de sangue de equídeos, positivos na “nested”
231 PCR para o gênero *Leishmania*.

232 As sequências de DNA foram determinadas em sequenciador automático ABI
233 377 (Applied Biosystems) utilizando-se 4µl de 2,5X Save Money (400mM Tris-HCl
234 pH 9,0, 10mM MgCl₂), 4µl de Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction
235 Kit v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 pmol dos oligonucleotídeos, e 4µl
236 do DNA genômico a 5ng/µl. As reações de sequenciamento foram realizadas em
237 termociclador Whatman Biometra (T Gradient) com os ciclos de temperatura
238 programados para 25 ciclos de 95°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4, com
239 rampa de 1°C/seg, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as
240 amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram
241 utilizadas duas reações, sendo uma para o primer forward e outra para o reverse.

242

243 **Xenodiagnóstico**

244 O xenodiagnóstico foi realizado em cinco equídeos positivos na “nested” PCR
245 para *Leishmania (Leishmania) infantum*. Foram utilizados, em média, 100 fêmeas de
246 flebotomíneos por animal no xenodiagnóstico. Os flebotomíneos foram submetidos a
247 uma dieta constituída apenas de solução de açúcar por um período de quatro dias.

248 Transcorrido esse período os insetos foram acondicionados em recipiente cilíndrico
249 plástico (6 cm de altura e 4cm de diâmetro) fechado com tela milimétrica de tecido
250 sintético.

251 Para realização da técnica diagnóstica os equídeos foram contidos
252 fisicamente utilizando-se cordas nos membros anteriores, posteriores e na região
253 cervical, e em seguida os insetos foram colocados em contato com a face interna
254 das orelhas (área sem pêlos) dos animais por um período de 50min para realização
255 do repasto sanguíneo.

256 Após realização do repasto os flebotomíneo foram transportados para o
257 Insetário do Departamento de Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da
258 Universidade Federal do Piauí onde foram transferidos para gaiola própria
259 (10x10x10 cm) e mantidos durante seis dias. Ao final desse período foi contabilizado
260 o número de mortos, posteriormente os vivos foram coletados e acondicionados em
261 tubos estéreis e mantidas a -20°C até o momento de sua utilização para pesquisa de
262 DNA de *Leishmania* e realização da PCR e “nested” PCR.

263

264 **Extração de DNA e reação de polimerase em cadeia (PCR) dos flebotomíneos**

265 A extração do DNA dos flebotomíneos foi realizada com “Chelex” (Bio-Rad). A
266 resina chelex é um estireno divinilbenzeno contendo iminodiacetato emparelhado,
267 que funcionam como grupos quelantes em ligações metálicas polivalentes que
268 degradam o DNA como o Mg (NOBEL, 2000). A solução com chelex foi preparada a
269 10% diluído em Tampão EDTA 1mM (TE) 1X. Em seguida foi adicionado 300µL em
270 microtubos plásticos de 1,5mL contendo o inseto e o macerou; agitou-se em vórtex
271 por 15s e centrifugou-se a 1300 RPM por 20min. Após centrifugação foi incubado
272 por 20min a 95°C em banho seco. Transcorrido este período foi agitado em vórtex

273 por 15 s e centrifugou-se a 1300 RPM por 20s. Retirou-se o sobrenadante e o
274 estocou a -20°C até o momento de sua utilização.

275 Para realização da “nested” PCR ITS’1 (ribossomal internal transcribed spacer
276 1) foram utilizadas placas (Applied Biosystems) com 4 µL de DNA, dois pares de
277 oligonucleotídeos iniciadores (primers). Na primeira fase da reação, que amplificou
278 parte do gene *ssu rDNA*, utilizando os seguintes primers: R221- 5’
279 GGTCCTTTCCTGATTTACG 3’; e R332- 5’ GGCCGGTAAAGGCCGAATAG 3’, e
280 na segunda reação os primers utilizados para amplificação foram 5.8S rRNA: LITSR-
281 5’_ CTGGATCATTTTCCGATG 3’ e L5.8S- 5’ TGATACCACTTATCGCACTT 3’,
282 conforme descrito por Schönian et al, (2003).

283 A reação da PCR foi preparada com 12,5 µL de Go-taq (Promega), 1,0 µL de
284 cada primer e 5,5 µL de água bidestilada conforme instruções do fabricante. A
285 amplificação foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient),
286 com um ciclo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de 30 segundos a
287 95°C, 30 segundos a 53°C, 1 minuto a 72°C e 10 segundos a 72°C. O produto da
288 “nested” PCR ITS’1 foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado
289 em gel red (2µg/ml) e visualizado em Transluminador UV (Bioagency). Após a
290 obtenção dos produtos de amplificação, com aproximadamente 603 bp para a
291 primeira reação e entre 300 a 350 bp para a segunda reação. Foi realizada digestão
292 dos produtos da PCR (10 µL) com enzima de restrição HaeIII, seguindo as
293 recomendações do fabricante (Hybaid GmbH Heidelberg, Alemanha). A reação de
294 digestão foi preparada com 7,3 µL de água bidestilada, 2 µL de tampão de reação
295 10X, 0,2 µL de Bovine Serum Albumin (BSA), 10 µL do produto de PCR e 0,5 µL da
296 enzima de restrição, incubando-se a 37°C por uma hora. Como controle positivo foi

297 utilizado produto de PCR de DNA extraído de cultura de promastigota de
298 *Leishmania*, e como controle negativo foi utilizado água bidestilada.

299 Os fragmentos de restrição foram analisados em gel de agarose a 3%,
300 corados em gel red(2µg/ml) e visualizado em Transluminador UV (Bioagency), e
301 realizado a identificação das espécies de leishmânias seguindo os parâmetros
302 estabelecidos por Schönian et al. (2003).

303

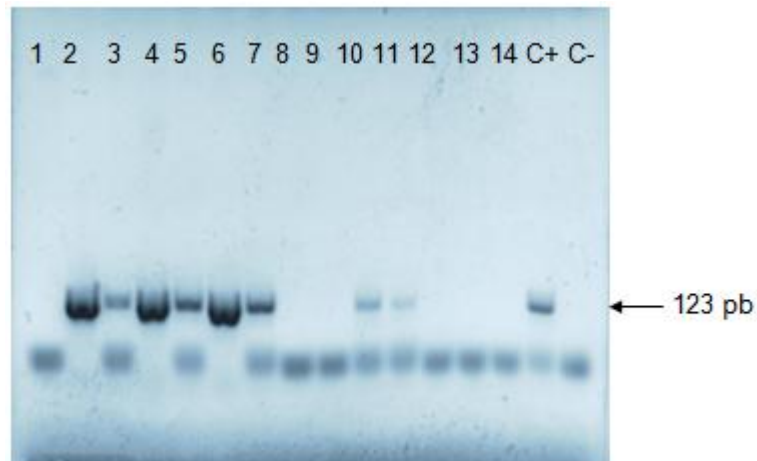
304 **Resultados e Discussão**

305 O grupo estudado neste trabalho foi constituído de 42 equídeos, sendo 31
306 equinos, quatro muares e sete asininos. Os animais não apresentavam sinais
307 clínicos sugestivos de qualquer forma de leishmaniose e nem de outras patologias,
308 entretanto 21 (50%) foram PCR positivas para *Leishmania* sp (14 equinos, quatro
309 asininos e três muares). A digestão do produto da “nested” PCR permitiu identificar
310 sequências de DNA característico de *Leishmania (Leishmania) infantum* (figura 1),
311 caracterizando a infecção como LVA. A identificação de espécie de leishmânia
312 realizada nesta pesquisa, está fundamentada em estudo por meio da digestão do
313 produto da PCR com enzima de restrição *Hae* III para a região ITS1 (SCHÖNIAN
314 et al., 2003).

315 O processo de digestão com a enzima *Hae* III foi realizado em 21 amostras,
316 sendo que em sete não foi possível determinar a que espécie de *Leishmania*
317 pertencia, devido a esse fato as amostras foram submetidas ao sequenciamento
318 gênico.

319 De acordo com a análise comparativa entre os fragmentos de DNA
320 sequenciados com os do site National Center for Biotechnology Information (NCBI)
321 (figura 3), cada uma das sequências obtidas são características da espécie

322 *Leishmania (Leishmania) infantum* (figura 2). A sequencia de bases nitrogenadas
 323 registradas no Gen Bank é compatível com a sequência determinada no
 324 sequenciamento das amostras positivas da “nested” PCR do sangue de equídeos.

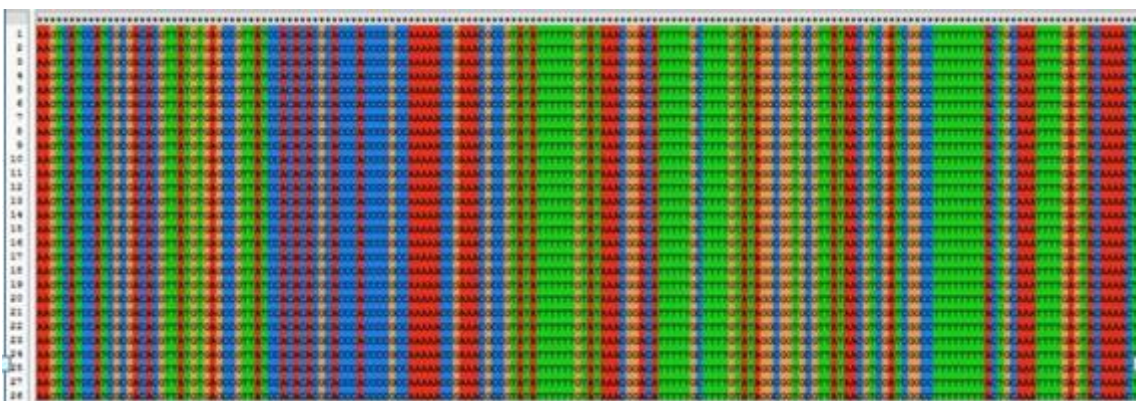


325

326 Figura 1. Análise dos produtos de digestão da PCR com enzima de restrição Hae III
 327 para a região ITS1 de *Leishmania* em amostras de sangue de equídeos em gel de
 328 agarose a 3%. Linhas 3, 5, 7, 10 e 11 representam fragmentos específicos para
 329 *Leishmania (Leishmania) infantum* a 123 bp.

330

331 AAGTCATCCATCGCGACACGTTATGTGAGCCGTTATCCACACACGCACCCACCC
 332 CGCCAA



333

334 Figura 2. Sequência de bases nitrogenadas e eletroferograma do sequenciamento
 335 gênico de amostras de sangue de equídeo positivo na “nested” PCR.

359 importantes em função de serem capazes de introduzir ou reintroduzir uma doença
360 numa nova região.

361 A presença de equídeos infectados na região pode ocasionar um incremento
362 na cadeia de transmissão da doença que mesmo podendo ser apenas um
363 hospedeiro acidental, aumentam as fontes de alimentação de flebotomíneos.

364 Equídeos infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* na área sugere
365 uma possível modificação na capacidade infectante desta espécie.

366 Em áreas endêmicas para LTA, a presença de mais espécies infectadas pelo
367 agente etiológico da doença, como os equídeos, que até então não havia sido
368 relatado, merece atenção especial para esse fato, pois mesmo que a população não
369 seja tão significativa, tende a promover um incremento na cadeia epidemiológica,
370 uma vez que esses animais convivem no peridomicílio e há proximidade muito
371 grande com a população tanto de tratadores como de moradores das regiões tanto
372 rural quanto periurbana, pois muitos desses animais são utilizados para o trabalho e
373 laser.

374 Até o presente momento não se tem conhecimento de infecção natural por
375 *Leishmania (Leishmania) infantum* em equídeos no Brasil, sendo este o primeiro
376 registro dessa ocorrência. No estado do Ceará/Brasil Cerqueira et al., (2003)
377 relatam um caso de jumento infectado experimentalmente por *Leishmania*
378 *(Leishmania) infantum*.

379 Todos os equídeos que fizeram parte deste estudo, eram assintomáticos, o
380 que aponta para a necessidade de realização de teste de infecção por leishmânia
381 em área endêmica para LV.

382 Na região de estudo, que é endêmica para LTA, não foi encontrada nenhuma
383 espécie de flebotomíneo relatado na literatura como transmissor dessa forma de

384 leishmaniose. A espécie encontrada foi *Lutzomyia longipalpis*, vetor de LV. Rey
385 (2002) relata que vários fatores contribuem para o poder infectante do flebotomíneo.
386 Dessa forma, espécies não relatadas até o momento como vetor de determinadas
387 espécies de leishmânia podem estar participando ao mesmo tempo do ciclo das
388 formas tegumentar e visceral na região.

389 A área estudada apresenta um conjunto de características que favorecem a
390 disseminação das leishmânias, tais como: baixo poder aquisitivo e de escolaridade
391 da população que vive em instalações precárias, ruas sem saneamento básico e
392 alagadiças, presença de acúmulo de lixo em muitas áreas, densa vegetação, áreas
393 de encostas, presença de animais silvestres e domésticos envolvidos no ciclo de
394 transmissão, contribuindo dessa forma para manutenção das leishmanioses.

395 A presença de animais infectados não significa que apresentarão a doença na
396 sua forma ativa. Muitos animais conseguem controlar o parasito por longo período
397 de tempo, permanecendo assintomáticos.

398 A avaliação da capacidade de uma espécie animal infectar os flebotomíneos é
399 realizada por meio do xenodiagnóstico. Essa técnica possibilita identificar os animais
400 infectados com potencial para infectar o vetor, constituindo prováveis mantedores do
401 ciclo epidemiológico (COURTENAY et al., 2002).

402 O grupo que foi submetido ao xenodiagnóstico foi constituído por cinco
403 equídeos dos 21 animais que foram positivos para *Leishmania (Leishmania)*
404 *infantum*, sendo um asinino, um equino e três muares. Os recipientes cilíndricos
405 contendo os flebotomíneos foram colocados na face interna da orelha dos equídeos
406 contendo em média 100 fêmeas por recipiente. O índice médio de mortalidade foi de
407 60%.

408 A infecção dos flebotomíneos foi avaliada por meio de “nested” PCR e não
409 houve positividade dos mesmos, fato que pode estar relacionado ao baixo número
410 de animais submetidos ao xenodiagnóstico, além disso, há relato de que cães
411 assintomáticos apresentam baixa capacidade para infectar flebotomíneos
412 (DRUMOND, 2013), o mesmo pode ter ocorrido com os equídeos. Esses resultados
413 também estão de acordo com os encontrados por Cerqueira et al., (2003) em
414 infecção experimental de asininos por *Leishmania (Leishmania) infantum*, que
415 igualmente realizou experimento com pequeno número de animais.

416 Os flebotomíneos não apresentaram positividade, ainda assim os equídeos
417 poderiam representar mais uma fonte de sangue para o vetor das leishmanioses,
418 contribuindo para o aumento de sua reprodução e densidade e, conseqüentemente,
419 aumentando os riscos de transmissão do agente etiológico na região endêmica
420 (CERQUEIRA et al., 2003).

421

422 **Conclusão**

423 Há presença de equídeos infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*
424 em Teresina/PI.

425 Os equídeos não tem a capacidade de infectar insetos vetores, entretanto
426 representam mais uma fonte de alimentação para os flebotomíneos, contribuindo
427 para sua sobrevivência, proliferação e sua manutenção na região.

428 A ausência de identificação de espécies de leishmânia causadoras de LTA
429 sugere que os equídeos não estão envolvidos no ciclo de transmissão dessa forma
430 de leishmaniose na região.

431

432

433 Referências Bibliográficas

434 Altamiro-Enciso, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e
435 mucosa pré e pós-colombianas. História, Ciências, Saúde-Manguinhos, v.10, n.3,
436 p.853-882, 2003.

437

438 Alves, W A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. Secretaria de
439 vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2009.

440 Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de
441 Análise de Situação de Saúde. Brasília; 2010.

442

443 Cerqueira, E. J. L. et al. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania*
444 *chagasi* Cunha & Chagas, 1937. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v..36, no.6, p.695-701.
445 2003.

446 Cortes. S.J da C., Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em
447 Portugal. Tese UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA INSTITUTO DE HIGIENE E
448 MEDICINA TROPICAL. 192f. Lisboa/Portugal. 2008

449

450 Courtenay, O.; Quinnell, R. J.; Garcez, L. M.; Shaw, J. J.; Dye, C. Infectiousness in a
451 Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in
452 Areas of High Transmission. Journal of Infectious Diseases, v. 186, n. 9, p. 1314-
453 1320, November 1, 2002.

454

- 455 Dantas-Torres, F.; Solano-Gallego, L.; Baneth, G.; Ribeiro, V. M.; Cavalcanti, M. P.;
456 Otranto, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities
457 and differences. *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.
458
- 459 Drumond, K. O.; Costa, F. A. L., Forty years of visceral leishmaniasis in the state of
460 Piauí; a review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 1,
461 p. 3-11, 2011.
- 462 Drumond, K.L. Carga parasitária na pele de cães com leishmaniose visceral
463 submetidos a tratamento em diferentes fases de manifestação da doença. Tese
464 doutorado, UFPI, Departamento de pós-graduação em ciência animal p. 48,
465 Departamento de patologia animal, Orientador Francisco Assis Lima Costa, 2013
466
- 467 Duarte, R. T.; Marzochi, F. A. O.; Ferreira, M. C. A.; Oliveira, F. C.; Mendez, M.R.F;
468 Gonzaga, F. A.; Sorologia para leishmaniose em equinos no município do Rio de
469 Janeiro, Saúde Rio – Secretaria Municipal de Saúde, 2001. Disponível em
470 [http://www.saude.rio.rj.gov.br/cgi/public/cgilua.exe/web/templates/htm/v2/view.htm?fr](http://www.saude.rio.rj.gov.br/cgi/public/cgilua.exe/web/templates/htm/v2/view.htm?from_info_index=25&user=reader&editionsectionid=2&infoid=36#navega)
471 [om_info_index=25&user=reader&editionsectionid=2&infoid=36#navega](http://www.saude.rio.rj.gov.br/cgi/public/cgilua.exe/web/templates/htm/v2/view.htm?from_info_index=25&user=reader&editionsectionid=2&infoid=36#navega)
472
- 473 Gontijo, C. M. F; Melo, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios
474 e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
475
- 476 Guerin, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and
477 treatment and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious*
478 *Diseases*. v.2, p. 494-501, 2002

479

480 Killick-Kendrick R.; Rioux J.A. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial
481 dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus siasi*. *Parasitology*,
482 44: 67-71, 2002.

483

484 Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Agravos Notificados (SINAN). Fundação
485 Municipal de Saúde (FMS) Teresina/PI, 2011.

486

487 Mohammadiha, A. et al., Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-
488 time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of
489 *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 2012 (article in
490 press). *Parassitologia*, 44: 67-71. .

491

492 Organização Panamericana de Saúde - OPAS. Encuentro sobre vigilancia,
493 prevención y control de leishmaniasis visceral (LV) en el Cono Sur de Sudamérica.
494 Foz do Iguazú, Brasil. Disponível em:

495 [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16961&](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16961&Itemid=)
496 Itemid=, [Acesso em setembro de. 2012]. 2009.

497

498 Rey, L. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara, 2º edição. p,379,
499 2002..

500

501 Rolão, N. et al. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, v. 12, p. 183–
502 186, 2005.

503

- 504 Sacks D.; Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host
505 interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55: 453-83. 2001.
506
- 507 Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig H.D, Presber W, Jaffe
508 C.L. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical
509 samples. *Diagn Micro-biol Infect Dis* 47: 349-358. 2003.
510
- 511 Solano-Gállego, L. et al. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine*
512 *Veterinary Journal*, v. 35, p. 320-323, 2003.
513
- 514 Sundar, S., Ray, M., Advances in the treatment of leishmaniasis. *Current Opinion on*
515 *Infectious Diseases*, 15: 593-8. 2002.
516
- 517 World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected
518 tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. 2010 [Acessado
519 em nov. 2012]. Disponível em [http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf)
520 [NTD_2010report_embargoed.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

ABRANTES, P.; SILVEIRA, H. Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, Lisboa, v. 27, n. 2, p. 71- 86, 2009.

AGUILAR, C.M. et al. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**: 471-72, 1984.

ALMEIDA, G F. Leishmaniose visceral e tegumentar canina: revisão de literatura. Monografia de Pós-Graduação em Clínica Médica e Cirurgia em Pequenos Animais . Universidade castelo Branco. Campo Grande, MS, 2006.

ALMEIDA, G. F. Leishmaniose Visceral e Tegumentar canina: Revisão de Literatura. 65p. Monografia (Obtenção de Título de Especialista em Clínica Médica e Cirurgia de Pequenos Animais.) –UCB, Campo Grande.2006

ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.*, v.127, n.3-4, p.227-32, 2005.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*. v.10. n. 3. p.853-82, 2003.

ALVAR, J., YACTAYO, S., BERN, C., Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 22: 552-7. 2006.

AULT, S. K. Pan American Health Organization's Regional Strategic Framework for addressing neglected diseases in neglected populations in Latin America and the Caribbean. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Sep 18, 2007.

BONFANTE-GARRIDO R. Leishmanias y leishmaniasis tegumentaria en America Latina. *Bol OfSanit Panam* 95: 418-424, 1983.

BOSANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar Americana. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 328-337, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Serie A. Normas Técnicas. Brasília: Ministério da Saúde, 120 p. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 120 p. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. Ed. Brasília, 179p. 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância e Saúde. Mapa de estratificação de LV, segundo município de residência e média de casos, de 2009 a 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/jpg/2012_11_areas_transmissao_lv_

BRASIL. Secretaria de Vigilância e Saúde. Mapa de estratificação de LV, segundo município de residência e média de casos, de 2009 a 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/jpg/2012_11_areas_transmissao_lv_brasil_2009_2011.jpg. Acesso em 12 de dez. 2012. 2011.
brasil_2009_2011.jpg. Acesso em: 09 dez. 2012. 2011

CAMARGO L. M. A.; BARCINSKI, M, A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*. 134-137, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil. São

Paulo - SP, 2004. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2004.

CASSILHAS, A. P. N. ANÁLISE GENÔMICA E PÓS-GENÔMICA DE PROTEÍNAS DE *Leishmania chagasi*. Universidade Federal de Pernambuco. Tese de doutorado. 197f. Recife, 2004.

CERQUEIRA, E. J. L. et al. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v..36, no.6, p.695-701. 2003.

CIMERMAN B.; CIMERMAN S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, 375p. 2001.

CORTES, S. J. D. C. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL, UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA, Lisboa, 2008.

COSTA C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Uberaba, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

COSTA, C.H.N.; GOMES, A.C.; COSTA, J.M.L.; VIEIRA, J.B.F.; LIMA, J.W.O.; COSTA, J. M. L. "Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil", Gazeta Médica da Bahia, 75, p.3-17. 2005.

DA SILVA, S. M.; RABELO, P. F. B.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 174, n. 1- 2, p. 150 -154, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and Control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 48, n.3, p. 151-156, mai./jun, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; CAVALCANTI, M. P.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DEDET, J.P., PRATLONG, F. Leishmaniasis. In *Manson's Tropical Diseases*, G. C.Cook,A. Zumla (Eds.), Saunders, London, pp. 1339-1364. 2003

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318. 2004

DIETZE, R. Mudanças no Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(2): 223-227, 2001

DOUGALL, A. et al., New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in northern Australian macro pods. *Epidemiol infect* 137 (10): 1516 -1520. 2009.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L., Forsty yars of visceral leishmaniasis in the state o Piauí; a review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 1, p. 3-11, 2011

DUARTE, R. T.et al. Sorologia para leishmaniose em equinos no município do Rio de Janeiro, Saúde Rio – Secretaria Municipal de Saúde, 2001. Disponível em: http://www.saude.rio.rj.gov.br/cgi/public/cgilua.exe/web/templates/htm/v2/view.htm?from_info_index=25&user=reader&editionsectionid=2&infoid=36#navega

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B. M.; BARROS, G.C.; MOMEN, H. & GRIMAL-DI Jr., G.,. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo

state, Brazil. Further evidence on the role dogs as reservoir of infection for humans. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 499-500. 1991.

FELICIANGELI M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 18: 71-80. 2004

GALATI E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In EF Rangel, R Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz; 23-51. 2003

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; REGO, F.A.R.; OSHIRO, M.R.C. Estudo de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul. Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V.34, n.3, p.302, 2001.

GENARO, O.; MARQUES, M.J.; REIS, A.B.; SILVA, A.L.F.F.; MICHALICK, M.S.M.; COSTA, C.A.; MAYRING, W.; DIAS, M. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. 10ed São Paulo: Atheneu, p.56-72, 2000.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.36, p. 71-80, 2003. In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. Anais.... p.26-30. 2003.

GONTIJO, C. M. F; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, G. JR; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 6, 230-250. 1993.

GUERRA, J. A. O. et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 22, p. 2319-2327, 2006.

KILLICK-KENDRICK R., RIOUX J.A. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus arisii*. Parasitology, 44: 67-71, Killiek-Kendrick R. 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. Clin Dermatol 17: 279-289. 2002.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology of phlebotomine sand flies. Clinics in Dermatology, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KOEHLER, R.C., GEBREMEDHIN, D., HARDER, D.R. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. J Appl Physiol 100:307–317.2006

KOEHLER, K. et al. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology, v. 109, p. 9–17, 2002.

LAURENTI, M. D. Patologia e patogenia das leishmanioses. Tese de livre docência. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia da universidade de São Paulo. Departamento de Patologia. 140p. 2010

leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 104, p. 937-954, 2009.

MADEIRA, M. F., UCHÔA, C. M.A.; LEAL, C. A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, p. 551-555, 2003.

MARTINS, L.M., REBELO, J.M.M., SANTOS, M.C.F.V., et al. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. Cad Saúde Pública. 20:735-43. 2004.

MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; LIMA, A.C.V.M.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; SANTOS, S.L.; BARATA, R.A.; ROMAMNHA, A.J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol. V.147, 1-2, p. 67-76, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Saúde Brasil 2009: uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde. Ministério da Saúde.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde. Brasília; 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Agravos Notificados (SINAN). Fundação Municipal de Saúde (FMS), Teresina/PI. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Agravos Notificados (SINAN). Fundação Municipal de Saúde (FMS), Teresina/PI. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Agravos Notificados (SINAN). Fundação Municipal de Saúde (FMS), Teresina/PI. 2010.

MISSAWA, N. A.; MACIEL, G. B. M. L.; RODRIGUES, H. Distribuição geográfica de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) no Estado de Mato Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, n. 4, p. 369-373, 2008.

MOREIRA, E.D.; DE SOUZA, V.M.M.; CARVALHO, L.P. Optimized dog-culling
NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M.E.M.C. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar nas Américas. Revista Percurso, v.1, n.1, Maringá, p 85 a 103, 2009.

MOURA, Ana Carolina Junqueira, 1982- M929a Avaliação clínico- laboratorial e do xenodiagnóstico de cães com anticorpos anti-leishmania e de cães vacinados com Leishmune®, provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina. 96 p. Orientador: Fabíola de Oliveira Paes Leme Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. 2013.

OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

OLIVEIRA-NETO MP, MATTOS M, PIRMEZ C, FERNANDES O, GONCALVES-COSTA SC, SOUZA CFS, GRIMALDI Jr G. Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42:321-325, 2000.

OLIVEIRA-NETO, M.P. et al. An outbreak of American cutaneous *leishmaniasis* (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurbana area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.83, p. 427-435, 1988.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous
Optimized dog-culling program does not reduce *Leishmania* infection in children in an endemic area: results of a community-based trial. In: *WORLDLEISH*, 3., 2005, Palermo-Terrasini. Abstract book of Third World Congress on Leishmaniasis. Sicília: [s.n.], p. 229. 2005

RAMOS-VARA, J.A. et al. Cutaneous leishmaniasis in two horses. *Veterinary Pathology*, v. 33, p. 731-734, 1996.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous
RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*, v. 24, n. 12, p. 2948-52, 2008.

ROLÃO, N. et al. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, v. 12, p. 183–186, 2005

SANTOS, G.P. L. et. al., Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, no município de Paracambi, Estado do Rio de

Janeiro, no período entre 1992 e 1993. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, p.161-166, 2005.

SOLANO-GÁLLEGO, L. et al. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Veterinary Journal*, v. 35, p. 320-323, 2003.

SOUSA, J. E. de M. F., Aspectos epidemiológicos da urbanização da leishmaniose visceral canina. TCC, 44 f. FMU, SP, 2008.

TOLEZANO, J. E. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 427–434, 1994.

VELÁSQUEZ, L.G. et al. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, v.22, p.571-578, 2006.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases: hidden successes, emerging opportunities. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_2006.2_eng.pdf. Acesso em 20/10/2013. Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Programmes and projects. Zoonoses and veterinary public health. Diseases information: Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/> . [Acesso em dezembro de 2013]. 2009

XIMENES M. F.F.M., SILVA V. P. M, QUEIROZ P. V. S, et al., *Phlebotomine* (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses. *Neotrop Entomol.* 36:128-37. 2007

ZANZARINI, P. D. et al. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Parana, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 109- 118, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE 01

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ENTREVISTA

BAIRRO/LOCALIDADE: _____

01. Identificação

Endereço: _____

Tempo de residência no local: _____

Procedência (última moradia: bairro; localidade; cidade; município; estado: _____

Pessoas na casa (); idade: () 0-5; () 6-15; () 16-40; () 41-59; () +60.

Famílias na casa ().

02. Escolaridade (família)

() analfabeto () fundamental incompleto () fundamental completo
() médio Incompleto () médio completo () superior completo
() superior incompleto.

03. Quantas pessoas trabalham na casa? ()

Ocupações: _____

Bairros/localidades/cidades onde trabalham _____ renda média/casa _____

04. Animais domésticos na casa?

() não () sim. Quantos? _____ Espécie _____

05. Animais silvestres em casa?

() não () sim. Quantos? _____ Espécie _____

06. Número de refeições por dia.

() três () duas () uma.

07. Abastecimento de água (água encanada)

() sim () não

Procedência da água _____

08. Abastecimento de água (água encanada)

() sim () não

Procedência da água _____

09. Sistema de esgoto

() rede oficial () fossas-séptica () úmida () rudimentar

() a céu aberto

10. Proximidade da mata (distância limite 500 metros)

() próximo () distante

11. Tem contato com animais silvestres (raposa, tatu, mucura, roedores)?

() não () sim. Quais? _____

12. Têm anexos no domicílio (galinheiro, chiqueiro)?

() não () sim. Quais? _____

13. Há presença de insetos na casa ou ao redor?

() não () sim

14. Como qualifica a situação de saúde de sua família?

() boa () regular () ruim

15. Sofrem de alguma doença? (chefe da família)

() não () sim qual? _____

16. Qual a doença mais frequente em seu bairro/localidade?

SITUAÇÕES DE SAÚDE A OBSERVAR NO BAIRRO/LOCALIDADE

01. Topografia/forma do terreno.

() área de baixada () área alta (cumes de morros) () encostas

() margem de rio/canal () outros

02. Uso do solo predominante

() residencial () industrial () comercial e serviços () agrícola

() área com vegetação natural (). Descrição-comentários-problemas

03. Densidade entre as habitações – proximidade e espaço entre as construções

() baixa () regular () elevada

04. Condições de moradia

() precária () semi-precária () permanente

05. Condições da pavimentação e da drenagem das ruas

() precária () adequada () inexistente

Descrição-comentários-problemas _____

06. Coleta de lixo

() regular () irregular () acumulado em locais

APÊNDICE 02

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: Leishmaniose Tegumentar em cães no município de Teresina

Pesquisador Responsável: Francisco Assis Lima Costa

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Federal do Piauí

Telefones para contato: (86) 9995-7788, (86) 3215-5760.

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos

R.G. _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

R.G. Responsável legal: _____

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Leishmaniose Tegumentar em cães no município de Teresina”, de responsabilidade do pesquisador Professor Doutor Francisco Assis Lima costa.

Este Projeto se justifica porque no Bairro Santa Teresa houve vários casos de Leishmaniose Tegumentar em moradores no ano de 2011, e ainda não houve nenhuma pesquisa que identificasse qual microrganismo que está provocando essa doença, bem o inseto que está transmitindo, bem como os animais que estão com a doença. Por isso o objetivo deste trabalho é tentar descobrir como a doença está sendo transmitida às pessoas, quais os animais e insetos envolvidos na transmissão, quais os riscos a que a população do bairro está exposta para contrair a doença e o que pode ser feito para melhorar a situação de saúde com relação á leishmaniose tegumentar.

Para isso, faremos entrevistas com os moradores do bairro, perguntando coisas a respeito da situação de saúde das pessoas, da situação do ambiente, sobre os animais de estimação. Também vamos colher sangue e partes de feridas que os animais possuam para fazer exames e verificar se eles estão contaminados e podem transmitir a leishmaniose tegumentar às pessoas, além de capturar insetos na residência e ao redor dela. Se for necessário tiraremos fotografias do local e dos animais.

Esta pesquisa não lhe trará desconfortos nem riscos de qualquer forma, e poderá trazer benefícios com a descoberta de como a doença está sendo transmitida, pois assim as autoridades de saúde (como o Programa Saúde da Família - PSF) poderão atuar para a prevenção.

Caso você tenha dúvidas sobre esta pesquisa, poderá entrar em contato a qualquer tempo com os pesquisadores envolvidos pelos telefones que estão acima. Sua participação é voluntária, ou seja, você só participa se quiser, e mesmo participando, poderá sair da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Seu nome será mantido em segredo em todas as etapas da pesquisa, assim como você não terá nenhuma despesa com a sua participação, e também não receberá quantia alguma por ela. Se você estiver incapacitado de responder à entrevista, uma pessoa responsável por você poderá dar as informações, desde que seja maior de idade.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de
pesquisa acima descrito.

Teresina, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

Testemunha

Testemunha